

María Mercedes Martín Pedrosa



ISOFORMAS DE ARGINASA DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) Ach.:
CARACTERIZACION Y REGULACION POR FENOLES

Directora: Prof. Dra. Dña. María Estrella Legaz González

Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad
de Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Vegetal I

1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Vegetal I

(Cátedra de Fisiología Vegetal)

**ISOFORMAS DE ARGINASA DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) Ach.:
CARACTERIZACION Y REGULACION POR FENOLES**

María Mercedes Martín Pedrosa

Madrid, 1993

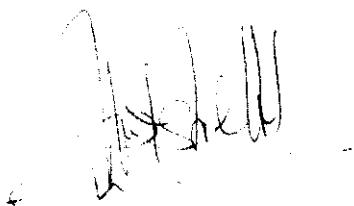
Trabajo realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio de 1993



Fdo: María Mercedes Martín Pedrosa

Conforme, la directora de la Tesis



Fdo: Prof. Dra. María Estrella Legaz González

La entrada del sendero era una suerte de arco que llevaba a un túnel lóbrego formado por dos árboles inclinados, demasiado viejos y ahogados por la hiedra y los líquenes colgantes para tener más que unas pocas hojas ennegrecidas.

(J.R.R. Tolkien, *El Hobbit*)

A mis padres y a Clara, con todo mi amor.

A Alfonso, Pili y Angel, por vuestro cariño y por estar siempre a mi lado.

La realización de esta Tesis Doctoral recoge el trabajo, tesón e ilusiones de otras personas a las que no deseo ni debo olvidar.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. M^a Estrella Estrella Legaz González, Prof. Titular de Fisiología Vegetal, la confianza que depositó en mí y la oportunidad ofrecida para realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por tu ayuda, tus desvelos, cuidados y enseñanzas para que el trabajo saliese siempre adelante. Ojalá que la semilla que en su día sembraste haya dado los frutos que esperabas.

Quiero agradecer al Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba, Catedrático de Fisiología Vegetal, no sólo sus acertados e inestimables comentarios aportados durante la realización de esta Memoria Doctoral, sino también el esfuerzo y las ilusiones puestas en este trabajo durante estos años. Gracias por escuchar mis interminables charlas, por tu ayuda, tus consejos y, cómo no, por tus silencios.

También quiero agradecer a los Profs. Dr. José Gavilanes y Dra. Rosalía Rodríguez, del Departamento de Bioquímica, la ayuda prestada en la realización de los análisis de aminoácidos de las isoformas de arginasa, así como en su interpretación.

A Carlos y Estrella, por vuestros ánimos en los momentos difíciles, vuestras alegrías y, sobre todo, por vuestra amistad.

También quiero recordar a Bernabé Bodas, por ayudarme a sobrellevar el sufrimiento del cromatografista en este mundo. Gracias por tus explicaciones y por acudir en mi auxilio cuando "Berni" o "Barbie" me hacían sufrir.

A mis compañeros, a los que hoy están conmigo y a los que se fueron. A José Luis, Silvia, María del Carmen, Elena, Adolfo, Luisa, María, Lourdes, Teresa, Aurelio y Raquel; gracias por compartir conmigo el día a día del trabajo, las ilusiones y los sinsabores de la investigación.

A Angel; gracias por acceder a todos nuestros deseos en la elaboración de esta Memoria Doctoral y, sobre todo, por tu enorme paciencia; estas ya son las páginas definitivas.

Deseo también expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| Ala | Alanina |
| Arg | Arginina |
| Asx | Acido aspártico o asparagina |
| Cys | Cisteína |
| d.i. | Diámetro interno |
| Da | Dalton |
| DO | Densidad óptica |
| EC | Electroforesis capilar |
| Glx | Acido glutámico o glutamina |
| Gly | Glicocola |
| His | Histidina |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución) |
| Ile | Isoleucina |
| K_m | Constante de Michaelis-Menten |
| $K_m(ap)$ | Constante de Michaelis-Menten aparente |
| $[L]$ | Concentración de ligando libre en equilibrio |
| Leu | Leucina |
| $[L]_i$ | Concentración inicial del ligando en su compartimento |
| L_p | Moles de ligando unido a la proteína |
| L_t | Moles totales de ligando en su compartimento |
| Lys | Lisina |
| M_r | Masa molecular |
| Met | Metionina |
| Phe | Fenilalanina |
| pI | Punto isoelectrico |
| Pro | Prolina |
| P_t | Moles totales de proteína |
| r | Moles de ligando unido por molécula de proteína |
| $[S_0]$ | Concentración de sustrato |
| $S_{0,5}$ | Concentración de sustrato que produce el 50% de la velocidad máxima de reacción |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| Ser | Serina |
| Thr | Treonina |
| Tris | Tri-hidroximetil-aminometano |
| Trp | Triptófano |
| Tyr | Tirosina |
| UAFE | Unidades de absorbancia a fondo de escala |
| UV | Luz ultravioleta |
| v_0 | Velocidad inicial de reacción |
| Val | Valina |
| v_{max} | Velocidad máxima de reacción |
| $v_{max}(ap)$ | Velocidad máxima de reacción aparente |
| V_t | Volumen total de la subcámara |
| $V_t[L]$ | Moles totales de ligando libre en ambas subcámaras |

INDICE

| | |
|--|----|
| I.- INTRODUCCION, | 1 |
| I.1.- CONCEPTO DE ISOFORMA E ISOENZIMA, | 2 |
| I.2.- ANALITICA DE LA DETECCION DE ISOFORMAS, | 4 |
| I.3.- ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN EXCLUSION MOLECULAR, | 6 |
| I.4.- ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LIGANDO-PROTEINA, | 11 |
| I.5.- ARGINASAS Y SUS ISOFORMAS, | 12 |
| I.6.- CATABOLISMO DE LA ARGININA EN LIQUENES, | 16 |
| I.6.1.- Arginasa y ornitina descarboxilasa, | 18 |
| I.6.2.- La vía descarboxilativa de la arginina, | 19 |
| I.6.3.- La síntesis y translocación de poliaminas, | 21 |
| I.6.4.- La función de la arginasa segregable, | 22 |
| I.6.5.- Isoformas como factores de desarrollo o de regulación metabólica, | 26 |
| II.- MATERIAL Y METODOS, | 30 |
| II.1.- MATERIAL VEGETAL, | 32 |
| II.2.- CONDICIONES DE INCUBACION, | 32 |
| II.3.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD ARGINASA, | 32 |
| II.4.- VALORACION DE PROTEINAS, | 33 |
| II.5.- PURIFICACION DE LAS ISOFORMAS DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA, ... | 33 |
| II.5.1.- Isoformas I y II de arginasa, | 33 |
| II.5.1.1.- Obtención del extracto libre de células, | 33 |
| II.5.1.2.- Precipitación con sulfato amónico, | 34 |
| II.5.1.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico, | 34 |
| II.5.1.4.- Electroenfoque en columna, | 35 |
| II.5.2.- Isoforma III de arginasa, | 36 |
| II.5.2.1.- Obtención del extracto libre de células, | 36 |
| II.5.2.2.- Precipitación con sulfato amónico, | 36 |
| II.5.2.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico, | 36 |
| II.5.2.4.- Electroenfoque en columna, | 36 |
| II.5.3.- Isoforma IV de arginasa, | 37 |
| II.5.3.1.- Obtención del extracto libre de células, | 37 |
| II.5.3.2.- Precipitación con sulfato amónico, | 37 |
| II.5.3.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico, | 37 |
| II.5.3.4.- Electroenfoque en columna, | 37 |

| | |
|--|----|
| II.6.- DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO, | 38 |
| II.6.1.- Mediante electroenfoque en columna, | 38 |
| II.6.2.- Mediante electroforesis capilar, | 38 |
| II.7.- ANALISIS DE AMINOACIDOS, | 39 |
| II.8.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC), | 40 |
| II.9.- CARACTERIZACION ESPECTROSCOPICA, | 43 |
| II.9.1.- Espectros de absorción ultravioleta, | 43 |
| II.9.2.- Espectros de emisión de fluorescencia, | 43 |
| II.10.- VALORACION DE FENOLES LIQUENICOS MEDIANTE HPLC, | 44 |
| II.10.1 - Extracción de fenoles con diferentes mezclas de disolventes orgánicos, | 44 |
| II.10.1.1.- A partir de talos, | 44 |
| II.10.1.2.- A partir del medio de incubación, | 44 |
| II.10.1.3.- A partir del extracto libre de células, | 45 |
| II.10.2.- Estabilidad de los fenoles en disoluciones acuosas, | 46 |
| II.10.3.- Espectro de absorción ultravioleta de fenoles líquénicos, | 48 |
| II.10.4.- Valoración de fenoles líquénicos mediante HPLC, | 48 |
| II.11.- CINETICA DE SATURACION EN AUSENCIA DE EFECTORES, | 49 |
| II.12.- CINETICA DE SATURACION EN PRESENCIA DE EFECTORES: ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO, | 50 |
| II.13.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y LA VELOCIDAD MAXIMA (v_{max}) DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA, | 51 |
| II.14.- ESTUDIOS DE LIGAMIENTO, | 51 |
| II.14.1.- Preparación de la membrana de diálisis, | 52 |
| II.14.2.- Células de diálisis, | 52 |
| II.14.3.- Determinación del tiempo de equilibrio, | 52 |
| II.14.4.- Cálculo del ligando unido, | 54 |
| II.14.5.- Representaciones gráficas de los datos de ligamiento, | 56 |
| II.14.6.- Análisis estadísticos y proceso de datos, | 57 |
| III.- RESULTADOS, | 58 |
| III.1.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA, | 59 |
| III.1.1.- Purificación y caracterización de las isoformas I y II de arginasa, | 60 |
| III.1.1.1.- Determinación del punto isoelectrico, | 61 |
| III.1.1.2.- Composición de aminoácidos, | 62 |
| III.1.1.3.- Determinación del peso molecular, | 63 |

| | |
|--|-----|
| III.1.2.- Purificación y caracterización de la isoforma III de arginasa, | 64 |
| III.1.2.1.- Determinación del punto isoelectrico, | 65 |
| III.1.2.2.- Composición de aminoácidos, | 66 |
| III.1.2.3.- Determinación del peso molecular, | 67 |
| III.1.3.- Purificación y caracterización de la isoforma IV de arginasa, | 67 |
| III.1.3.1.- Determinación del punto isoelectrico, | 68 |
| III.1.3.2.- Composición de aminoácidos, | 69 |
| III.1.3.3.- Determinación del peso molecular, | 70 |
| III.2.- CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LAS ISOFORMAS I, III Y IV DE ARGINASA, | 121 |
| III.2.1.- Espectros de absorción ultravioleta, | 122 |
| III.2.2.- Espectros de fluorescencia, | 122 |
| III.3.- ANALISIS Y CUANTIFICACION DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO, | 134 |
| III.3.1.- Espectros de absorción ultravioleta, | 135 |
| III.3.2.- Estabilidad en disoluciones tamponadas, | 135 |
| III.3.3.- Separación y cuantificación mediante HPLC, | 136 |
| III.3.4.- Valoración del contenido de fenoles en muestras de córtex, talo y medio de incubación, | 137 |
| III.3.5.- Valoración del contenido de fenoles solubles en el extracto libre de células, .. | 138 |
| III.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE EFECTORES, | 157 |
| III.4.1.- Sobre la isoforma I de arginasa, | 158 |
| III.4.2.- Sobre la isoforma III de arginasa, | 160 |
| III.4.3.- Sobre la isoforma IV de arginasa, | 161 |
| III.5.- EVALUACION DE LA COOPERATIVIDAD. ECUACION DE HILL, | 180 |
| III.6.- LIGAMIENTO DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO A LAS ISOFORMAS I, III Y IV DE ARGINASA, | 182 |
| III.6.1.- Ligamiento a la isoforma I, | 183 |
| III.6.1.1.- Atranorina como ligando, | 183 |
| III.6.1.2.- Acido evérnico como ligando, | 184 |
| III.6.1.3.- Acido úsnico como ligando, | 184 |
| III.6.2.- Ligamiento a la isoforma III, | 185 |
| III.6.2.1.- Atranorina como ligando, | 185 |
| III.6.2.2.- Acido evérnico como ligando, | 185 |
| III.6.2.3.- Acido úsnico como ligando, | 186 |
| III.6.3.- Ligamiento a la isoforma IV, | 186 |
| III.6.3.1.- Atranorina como ligando, | 186 |
| III.6.3.2.- Acido evérnico como ligando, | 187 |
| III.6.3.3.- Acido úsnico como ligando, | 187 |

| | |
|---|-----|
| III.7.- EFECTO DEL LIGAMIENTO DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO PRODUCIDO EN LAS ISOFORMAS DE ARGINASA, | 226 |
| III.7.1.- Isoforma I, | 227 |
| III.7.2.- Isoforma III, | 227 |
| III.7.3.- Isoforma IV, | 228 |
| IV.- DISCUSION, | 232 |
| V.- CONCLUSIONES, | 253 |
| VI.- BIBLIOGRAFIA, | 262 |

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|-----|
| Esquema del catabolismo de arginina en <i>Evernia prunastri</i> | 17 |
| Figura 1.- Ejemplar de <i>E. prunastri</i> | 31 |
| Figura 2.- Diagrama de flujo de extracción de fenoles..... | 47 |
| Tabla I.- Cantidad de efector en las mezclas de reacción utilizadas en la valoración de la actividad arginasa..... | 50 |
| Tabla II.- Representaciones gráficas para la determinación de K_m y v_{max} de las isoformas de arginasa..... | 51 |
| Figura 3.- Esquema del equilibrio de diálisis..... | 53 |
| Tabla III.- Representaciones gráficas de los datos del ligamiento..... | 57 |
| Tabla IV.- Purificación de las isoformas I y II de arginasa..... | 72 |
| Figura 4.- Purificación de las isoformas I Y II de arginasa mediante HPLC de exclusión molecular..... | 73 |
| Figura 5.- Electroenfoque en columna de la isoforma I de arginasa..... | 75 |
| Figura 6.- Electroenfoque en columna de la isoforma II de arginasa..... | 77 |
| Figura 7.- Esquemas de capilares de sílice fundida..... | 79 |
| Figura 8.- Anatomía interna de los capilares de sílice fundida..... | 81 |
| Figura 9.- Electroforegramas de la isoforma I de arginasa..... | 83 |
| Figura 10.- Rectas de calibrado en electroforesis capilar para las isoformas I y II de arginasa..... | 85 |
| Tabla V.- Composición de aminoácidos de las isoformas I y II de arginasa..... | 87 |
| Figura 11.- Cromatograma de proteínas patrón separadas en HPLC de exclusión molecular utilizando una columna TSK G5000 PWXL..... | 88 |
| Figura 12.- Cromatograma de proteínas patrón separadas en HPLC de exclusión molecular utilizando dos columnas Zorbax-diol en serie, GF450-GF250..... | 90 |
| Tabla VI.- Eficiencia de las columnas TSK G5000 PWXL y Zorbax-diol GF450-GF250, analizada como número de platos teóricos..... | 92. |
| Figura 13.- Cromatogramas de la isoforma I de arginasa desnaturalizada, obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular utilizando dos columnas Zorbax-diol en serie, GF450-GF250..... | 93 |
| Figura 14.- Rectas de calibrado en HPLC de exclusión molecular para las isoformas I y II de arginasa..... | 95 |
| Tabla VII.- Purificación de la isoforma III de arginasa..... | 97 |
| Figura 15.- Purificación de la isoforma III de arginasa mediante HPLC de exclusión molecular..... | 98 |
| Figura 16.- Electroenfoque en columna de la isoforma III de arginasa..... | 100 |
| Figura 17.- Electroforegramas de la isoforma III de arginasa..... | 102 |
| Figura 18.- Recta de calibrado en electroforesis capilar para la isoforma III de arginasa..... | 104 |
| Tabla VIII.- Composición de aminoácidos de la isoforma III de arginasa..... | 106 |
| Figura 19.- Rectas de calibrado en HPLC de exclusión molecular para la isoforma III de arginasa..... | 107 |
| Tabla IX.- Purificación de la isoforma IV de arginasa..... | 109 |
| Figura 20.- Purificación de la isoforma IV de arginasa mediante HPLC de exclusión molecular..... | 110 |
| Figura 21.- Electroenfoque en columna de la isoforma IV de arginasa..... | 112 |
| Figura 22.- Electroforegramas de la isoforma IV de arginasa..... | 114 |
| Figura 23.- Rectas de calibrado en electroforesis capilar para la isoforma IV de arginasa..... | 116 |
| Tabla X.- Composición de aminoácidos de la isoforma IV de arginasa..... | 118 |

| | |
|--|-----|
| Figura 24.- Rectas de calibrado en HPLC de exclusión molecular para la isoforma IV de arginasa..... | 119 |
| Figura 25.- Espectros de absorción ultravioleta de las isoformas I, III y IV de arginasa..... | 124 |
| Figura 26.- Espectro de emisión de fluorescencia de las isoformas I, III y IV de arginasa, excitando a 275 nm..... | 126 |
| Figura 27.- Espectro de emisión de fluorescencia de las isoformas I, III y IV de arginasa, excitando a 295 nm..... | 128 |
| Figura 28.- Espectro de emisión de fluorescencia de las isoformas I, III y IV de arginasa, excitando a 257 nm..... | 130 |
| Figura 29.- Espectros de emisión y excitación simultánea de fluorescencia de las isoformas I, III y IV de arginasa..... | 132 |
| Figura 30.- Espectros de absorción ultravioleta de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico..... | 141 |
| Figura 31.- Estabilidad de atranorina en disolución acuosa..... | 143 |
| Figura 32.- Estabilidad de ácido evérnico en disolución acuosa..... | 145 |
| Figura 33.- Estabilidad de ácido úsnico en disolución acuosa..... | 147 |
| Figura 34.- Cromatogramas representativos de los fenoles de <i>E. prunastri</i> | 149 |
| Tabla XI.- Ecuaciones de las rectas de calibrado empleadas en la cuantificación de fenoles..... | 151 |
| Figura 35.- Variación de la cantidad de fenoles en función del tiempo de incubación de los talos de <i>E. prunastri</i> en L-arginina 40 mM..... | 152 |
| Figura 36.- Variación de la cantidad de fenoles en función del tiempo de incubación de los talos de <i>E. prunastri</i> en cicloheximida 40 μ M..... | 154 |
| Tabla XII.- Cantidad de fenoles endógenos en talos de <i>E. prunastri</i> | 156 |
| Figura 37.- Efecto de la concentración de L-arginina sobre la velocidad de reacción de la isoforma I de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 163 |
| Figura 38.- Representación de Eisenthal-Cornish-Bowden de la isoforma I de arginasa..... | 165 |
| Figura 39.- Representación de Hanes de la isoforma I de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 167 |
| Figura 40.- Efecto de la concentración de L-arginina sobre la velocidad de reacción de la isoforma III de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 169 |
| Figura 41.- Representación de Hill de la isoforma III de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 171 |
| Figura 42.- Efecto de la concentración de L-arginina sobre la velocidad de reacción de la isoforma IV de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 173 |
| Figura 43.- Representación de Eisenthal-Cornish-Bowden de la isoforma IV de arginasa..... | 175 |
| Figura 44.- Representación de Hanes de la isoforma IV de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores..... | 177 |
| Tabla XIII.- Constantes cinéticas de las isoformas I, III y IV de arginasa..... | 179 |
| Tabla XIV.- Ecuaciones de las rectas obtenidas mediante la representación de Hill para la evaluación de la cooperatividad..... | 181 |
| Tabla XV.- Tiempo para el equilibrio del ligando libre..... | 189 |
| Figura 45.- Ligamiento de atranorina a la isoforma I de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas..... | 190 |
| Figura 46.- Ligamiento de atranorina a la isoforma I de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 192 |
| Figura 47.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma I de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas..... | 194 |

| | |
|--|-----|
| Figura 48.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma I de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 196 |
| Figura 49.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma I de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 198 |
| Figura 50.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma I de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 200 |
| Figura 51.- Ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 202 |
| Figura 52.- Ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 204 |
| Figura 53.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma III de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 206 |
| Figura 54.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma III de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 208 |
| Figura 55.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma III de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 210 |
| Figura 56.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma III de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 212 |
| Figura 57.- Ligamiento de atranorina a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 214 |
| Figura 58.- Ligamiento de atranorina a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 216 |
| Figura 59.- 0Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 218 |
| Figura 60.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 220 |
| Figura 61.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas. | 222 |
| Figura 62.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma IV de arginasa. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica..... | 224 |
| Tabla XVI.- Formación de distintos agregados de arginasa como consecuencia del ligamiento. | 229 |
| Figura 63.- Cromatogramas de los distintos agregados de arginasa tras el ligamiento del efector. | 230 |
| Tabla XVII.- Conclusiones..... | 257 |

1.- INTRODUCCION

1.1.- CONCEPTO DE ISOFORMA E ISOENZIMA.

Las isoenzimas fueron definidas hace más de 30 años como *sucesos interesantes, pero raros*, en los procesos de purificación de proteínas. El término isoenzima fue acuñado por Markert y Moller (1959) como una definición operacional que agrupaba múltiples formas enzimáticas con la misma especificidad de sustrato. Desde entonces, cientos de enzimas han sido resueltas en formas moleculares varias, provocando controversias en el campo de la Genética y la Evolución. Por otro lado, el estudio de las isoenzimas ha permitido ampliar el conocimiento de mecanismos sofisticados de regulación metabólica en bacterias, plantas y animales.

Se definen como isoenzimas diversas formas de una proteína que catalizan la misma reacción, pero que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos o en su estructura. Por ello, pueden separarse mediante electroforesis o cromatografía y pueden distinguirse al estudiar la variación en la secuencia de sus aminoácidos o las diferencias en el segmento de los DNAs que las codifican (Scandalios, 1974). Secundariamente, pueden encontrarse isoenzimas en el mismo o diferente compartimento celular, en diferentes células o tejidos de un organismo, o bien pueden ser producidas durante estados diferentes del desarrollo de un único individuo (Weeden, 1983).

Dos formas de una única enzima pueden ser originadas por mecanismos genéticos (múltiples *loci* o múltiples genes) o por mecanismos post-traduccionales, siendo este último procedimiento el más sencillo. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales incluyen glicosilaciones, proteolisis limitada, agregaciones, modificaciones covalentes de la cadena polipeptídica (Cerff, 1978; Gockel y Lebherz, 1981; Motojima y Sakaguchi, 1982; Sticher y Jones, 1992), etc. En el caso concreto de enzimas de origen vegetal, estas modificaciones representan una importante fuente de variabilidad isoenzimática. Así, las isoenzimas de aminopeptidasas, endopeptidasas y peroxidasas han sido estudiadas en profundidad muy especialmente (Beevers, 1982).

El término isoenzima es, a menudo, utilizado libremente en un sentido operativo y se tiende a aplicar a cualquier tipo de multiplicidad enzimática observada. Normalmente, desde la primera sospecha de existencia de una isoenzima, es necesario realizar numerosas pruebas

experimentales para establecer claramente su naturaleza y origen. En este sentido, la nomenclatura establecida por la IUPAC-IUB (1971) recomienda el uso restringido del término *isoenzima* a productos de multiplicidad debidos a causas genéticas. Esto, por tanto, excluye todas las múltiples formas originadas por modificaciones post-traduccionales, aunque muchas enzimas, con un importante papel fisiológico y regulador, sufran estas últimas modificaciones (Newton y Schwartz, 1980). De acuerdo con estas recomendaciones, las múltiples formas detectadas para una enzima no pueden ser denominadas *isoenzimas* hasta haber demostrado que su origen se debe a diversidad genética. Griffiths y Black (1987), tras estudiar las diferentes formas de fosfatasa alcalina en suero humano, proponen el término *isoforma* para todas aquellas formas de una misma enzima cuyo origen no está totalmente establecido o es claramente post-traduccional.

Antes del descubrimiento de las isoformas, las diferencias metabólicas entre diferentes tejidos eran explicadas en términos de variación de la cantidad relativa de cada enzima, aunque también se consideraban importantes, en este contexto, sucesos de permeabilidad, compartimentación o concentración y modulación por diferentes metabolitos. La amplia distribución de isoformas y el hecho de que aquellas difieran, no sólo en su distribución tisular, sino también en sus propiedades cinéticas, permitió a los enzimólogos establecer su papel metabólico dependiendo más de la "calidad" que de la "cantidad" de la proteína. Uno de los primeros y más claros ejemplos del papel de las isoformas fue su acción en la regulación metabólica de una célula o tejido. Una única ruta metabólica debe, por definición, consistir en la misma secuencia de reacciones enzimáticas. Sus características reguladoras pueden variar fuertemente dependiendo de qué isoforma en particular actúe en cada paso. En una ruta bien conocida, como es la glucólisis, nueve de las diez enzimas implicadas en la conversión de glucosa en piruvato presentan isoformas o *isoenzimas*. Quizá uno de los hechos más importantes a este respecto sea la existencia de diferentes *isoenzimas* (o *isoformas*) en un único tejido, lo cual proporciona una complicación temporal adicional al hecho de la diferenciación (Rider y Taylor, 1980).

1.2.- ANALITICA DE LA DETECCION DE ISOFORMAS

Las isoformas pueden diferir unas de otras en algunas de sus propiedades físicas y cinéticas, así como en su distribución tisular. Aunque algunas de sus propiedades puedan parecer más relevantes que otras, cualquier diferencia o similitud, en términos metabólicos, resultará importante para determinar su función fisiológica.

En el análisis de isoformas deben utilizarse métodos que no compliquen su separación física. Así, los métodos basados en las características inmunológicas de la proteína pueden aplicarse a mezclas o extractos parcialmente purificados. Goffner *et al.* (1992) mostraron las relaciones inmunológicas entre dos isoformas de cinamilalcohol deshidrogenasa en un extracto crudo obtenido de xilema de *Eucalyptus gunii* o bien entre dichas isoformas parcialmente purificadas. Sin embargo, la mayoría de los análisis requieren la separación de cada una de las isoformas enzimáticamente activas. La purificación y caracterización de isoformas no difiere, en principio, de los protocolos comunes de purificación de cualquier otra proteína. La única precaución específica consistiría en evitar concienzudamente la inactivación de alguna de las isoformas, ya que dicha inactivación, de suceder, llevaría a la suposición errónea de su ausencia (Botha y Turpin, 1990). Inicialmente, pueden separarse isoformas mediante técnicas que discriminen entre sus propiedades físicas, como puede ser la cromatografía por interacción hidrofóbica (Goffner *et al.*, 1992) o de intercambio iónico (Botha y Turpin, 1990). Si las isoformas tienen una diferente localización subcelular, suele ser suficiente con un protocolo de separación de cada uno de los orgánulos (Li *et al.*, 1991).

Dado que la diferencia real entre isoformas se establece a nivel de su actividad específica (v_{\max} y K_m), pH óptimo de reacción, punto isoelectrico, peso molecular y composición de aminoácidos, una primera aproximación a la caracterización de diferentes formas enzimáticas debe contemplar estos parámetros. Por ejemplo, una de las isoformas de fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Selenastrum minutum* es soluble en ácido y dependiente de un medio reductor para su actividad y estabilidad a altas temperaturas (60°C). Por ello, concentraciones suficientes de ditioneitol (DTT) deben estar en contacto con la enzima en todos los pasos de su purificación. Su pH óptimo es

cercano a la neutralidad y muestra ser cuatro veces más afín por su sustrato que la isoforma insoluble en ácido, la cual posee características opuestas a la anterior (Botha y Turpin, 1990; Turpin *et al.*, 1990). También se han descrito diferencias a nivel de pH óptimo, constantes cinéticas y localización celular (mitocondrial y citosólica) para isoformas de ATP sulfurilasa de *Euglena gracilis*, siendo la forma mitocondrial cuatro veces más afín por su sustrato que la citosólica (Li *et al.*, 1991). Los autores relacionan estas diferencias con el metabolismo del alga, pues la reducción del sulfato es mucho más activa en las mitocondrias. Sin embargo, hay isoformas que no presentan diferencias en sus parámetros cinéticos, como es el caso de dos descritas para la almidón sintasa, aisladas de embriones de guisante (Denyer y Smith, 1992). Ambas poseen el mismo valor de pH óptimo, el mismo valor de K_m para ADPglucosa y amilopectina, ambas son termolábiles y reconocidas por los mismos anticuerpos, pero difieren claramente en su localización celular (soluble o ligada a gránulos) y en su peso molecular.

Junto con la caracterización cinética y la localización subcelular, el estudio electroforético de isoformas es otro punto clave para su correcta determinación. La electroforesis es utilizada para poner de manifiesto la existencia de varias formas enzimáticas, para valorar el pI de cada una de esas formas y su peso molecular. El soporte utilizado es generalmente variado: almidón, agarosa, acetato de celulosa o poliacrilamida son los más utilizados. Una práctica habitual en estos estudios es el empleo de diferentes técnicas electroforéticas en el mismo análisis. Accorsi *et al.* (1987) realizaron un estudio de las isoformas de fosfoglucomutasa de eritrocitos mediante electroforesis en geles de almidón y electroenfoque en columna o en geles de poliacrilamida. En todos los casos fueron identificadas cuatro isoformas de la enzima. Ya que la movilidad electroforética en los geles de almidón es utilizada como un reflejo de las diferencias de pI de las diferentes isoformas, las descritas para fosfoglucomutasa eran de carácter ácido, si bien las pequeñas diferencias detectadas en los valores de pI (± 0.3) fueron atribuidas a diferencias entre las técnicas utilizadas. Sticher y Jones (1992) también emplearon el isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida para determinar el valor de pI de las diferentes isoformas de α -amilasa de embriones de guisante, revelando el carácter ácido de todas ellas. Trudel *et al.* (1989) desarrollaron un sistema de electroenfoque bidimensional en poliacrilamida para la detección de

isoformas ácidas y básicas de quitinasa de tabaco, de las cuales, Majeau *et al.* (1990) lograron determinar 13 diferentes a partir de semillas de pepino, usando la misma técnica.

Otro punto a considerar en la determinación de isoformas de enzimas es la diferencia de peso molecular que aquellas presentan entre sí. Habitualmente se emplea la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), con o sin agentes desnaturizantes, como por ejemplo, dodecilsulfato sódico (SDS), o bien filtración a través de columnas de Sephadex para estimar el peso molecular de las proteínas. Normalmente, el empleo de columnas de filtración produce una sobreestimación del peso molecular de una isoforma particular frente a SDS-PAGE. Las diferencias de peso molecular entre formas monoméricas cubren un amplio rango, desde 3 kDa, aproximadamente, para la forma CAD1 de la cinamilalcohol deshidrogenasa (O'Malley y Sederoff, 1990) a más de 10 kDa para las isoformas de ATP sulfurilasa de *E. gracilis* (Li *et al.*, 1991). Las diferencias entre isoformas se establecen usualmente por comparación entre los pesos moleculares obtenidos en SDS-PAGE. Así, las dos isoformas de almidón sintasa analizadas por Denyer y Smith (1992) difieren en 17 kDa. Menores diferencias se obtienen para las isoformas de arginasa de hígado de ratón, 3 kDa aproximadamente (Spolarics y Bond, 1988).

La composición de aminoácidos proporciona una primera visión de la similitud entre isoformas, si bien las homologías y las diferencias deben establecerse sobre la base de la secuencia de aminoácidos. Algunos autores comparan los patrones polipeptídicos obtenidos en PAGE tras una proteólisis parcial (Borkovich y Weiss, 1987a; Goffner *et al.*, 1991) o un fraccionamiento químico (Lischwe y Ochs, 1982) de las isoformas para establecer homologías.

I.3.- ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN EXCLUSION MOLECULAR

La estimación de los valores de pI y peso molecular de isoformas son dos criterios básicos para su caracterización. El empleo de la electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar ambos parámetros requiere un largo periodo de tiempo, tanto para la preparación de los geles como para el desarrollo de la separación y la posterior tinción de la muestra. El desarrollo de

técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación de proteínas y péptidos y la electroforesis capilar ofrecen la posibilidad de un análisis rápido, eficaz y altamente sensible de proteínas frente a métodos tradicionales.

En la última década, la cromatografía líquida de alta resolución ha sido ampliamente usada en el análisis y la purificación de las proteínas. Básicamente se han descrito tres diferentes estrategias para lograr una buena separación. La primera se centra en mecanismos de intercambio iónico: la proteína se comporta como un ión y su retención, resolución y detección se produce gracias a su interacción, como tal ión, con la fase estacionaria (Yuan y Pietrzyk, 1990). La segunda aproximación se realiza mediante columnas de fase reversa. El interés principal de este procedimiento reside en la hidrofobicidad de la fase estacionaria, su estabilidad frente a posibles hidrólisis proteicas, así como la estructura del poro de la matriz de sílice. Sin embargo, no hay relación alguna entre la retención de la muestra en la columna y su peso molecular, por lo que la separación se lleva a cabo sobre la base de la hidrofobicidad de la proteína (Davankov *et al.*, 1990; Pedroso *et al.*, 1987). En la tercera estrategia, la cromatografía de exclusión molecular, la más usada en el análisis y caracterización de proteínas, la separación se lleva a cabo de acuerdo con el peso molecular de la muestra.

La cromatografía de permeación o filtración se estableció inicialmente con el uso de geles formados por entrecruzamiento y unión de dextranos con epíclorhidrina (Sephadex). Sin embargo, el proceso de preparación de estos geles no rinde matrices totalmente homogéneas, lo que limita en gran medida la resolución de la columna (Warzecha *et al.*, 1990). Por el contrario, la cromatografía de exclusión molecular emplea fases estacionarias generalmente rígidas, basadas en resinas poliméricas como el polimetacrilato, o bien en micropartículas de sílice que son estables en fases acuosas para un intervalo de pH de 4 a 9. Mediante el uso de estas fases se logra una alta resolución, eficacia y reproducibilidad frente a los sistemas tradicionales de filtración (Fallon *et al.*, 1987), además de permitir la recuperación de más del 90% de la muestra empleada.

La separación de muestras en HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC) requiere un soporte inerte frente a interacciones iónicas, hidrofóbicas o de adsorción. Esto implica una elección adecuada de la columna así como de la fase móvil para obtener la máxima eficacia

(Fallon *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1989). La columna debe contener un relleno altamente hidrofílico, como es el caso de las columnas TSK-PWXL o Zorbax-diol. La presencia de grupos residuales carboxilo en la superficie de empaquetamiento para la primera y los grupos dialcohol para la segunda dan como consecuencia una correcta relación entre los tiempos de retención obtenidos para cada proteína y el peso molecular de la misma (Nagy, 1990). La fase móvil puede afectar a la resolución a través de la interacción directa con la fase estacionaria y con el soluto. La manipulación del pH y de la fuerza iónica del tampón utilizado como eluente evitará otras interacciones indeseables (Ujházy *et al.*, 1989). Por otro lado, se recomienda el uso de columnas cortas con un diámetro de partícula pequeño, pues éstas permiten operar con bajos valores de flujo ($0,3-1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), reduciendo el término de transferencia de masas, de gran importancia para optimizar las separaciones de proteínas (Fallon *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1990).

La posibilidad de incluir agentes fuertemente desnaturizantes, como SDS al 0.1% o cloruro de guanidina 6M en las fases móviles utilizadas en SE-HPLC, supone otra ventaja de esta técnica. La adición de agentes desnaturizantes reduce cualquier interacción química del soluto con la fase estacionaria, elimina las interacciones hidrofóbicas y la proteína se comporta de forma ideal. En el caso de proteínas formadas por varias subunidades, la combinación de fases conteniendo SDS con la desnaturización previa de la proteína nos permitirá calcular el peso molecular del monómero. La comparación de este método con SDS-PAGE permite concluir, razonablemente, que la cromatografía es más adecuada, sobre todo si se conocen previamente un cierto número de propiedades de la proteína sujeto de la separación (Fallon *et al.*, 1987).

La electroforesis es una poderosa herramienta para la separación de especies iónicas, especialmente biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos. Durante los últimos cuarenta años, electroforesis en papel, almidón, acetato de celulosa, agarosa o poliacrilamida han sido empleadas para separar péptidos, proteínas y polinucleótidos. A pesar de su versatilidad y utilidad, la realidad es que se trata de un método laborioso y relativamente lento.

Desde su descripción, en los años 30, la técnica electroforética ha experimentado importantes avances. La electroforesis capilar zonal fue desarrollada por Mikkers *et al.* (1979) para la separación de pequeños aniones como, por ejemplo, el anión cloruro, por detección

conductimétrica en un capilar de Teflon, de 200 μm de diámetro interno. Jorgenson y Lukacs (1981) realizaron detallados estudios en electroforesis capilar utilizando columnas de vidrio y sílice fundida y acoplando sistemas de detección óptica. Algunos de sus primeros estudios con mezclas de aminoácidos dansilados muestran eficacias de $\simeq 250.000$ platos teóricos, empleando voltajes de $300 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ de capilar.

El diseño experimental para llevar a cabo una electroforesis capilar es relativamente sencillo: un capilar cuyos extremos están sumergidos en un reservorio lleno de un electrolito y un electrodo de alto voltaje. Cerca de uno de los extremos del capilar se construye una ventana frente a la que se sitúa el detector, habitualmente espectrofotométrico en la zona ultravioleta (Compton y Browlee, 1988; Lux *et al.*, 1990). El capilar, lógicamente, representa la columna de separación. Se trata, en general, de un capilar de sílice fundida cubierto de poliimida, lo que le proporciona gran flexibilidad. La sílice fundida posee una alta transparencia en el UV-visible y es, por tanto, un material deseable para estos sistemas de detección. El desarrollo reciente de columnas capilares ha representado un importante avance técnico en la electroforesis capilar zonal (Ewin *et al.*, 1989; Gordon *et al.*, 1988; Gross y Yeung, 1990; Grossman *et al.*, 1989). La técnica con columnas capilares es deseable por su automatización con datos de análisis a tiempo real. Las cantidades de muestra usadas son del rango de nanolitros y el volumen de tampón usado suele estar en el rango de los mililitros. El tampón, usado como electrolito, es estable dentro del capilar frente a movimientos de convección o difusión.

En general, las sustancias a separar, al encontrarse a un determinado pH, adquieren una carga neta (positiva o negativa) en función de la cual se desplazan a lo largo del capilar cuando se aplica en éste una diferencia de potencial entre sus extremos. La carga de un pequeño péptido puede ser estimada a partir de los valores de pK_a de los aminoácidos individualmente considerados y en función de la relación carga/masa se puede predecir su movilidad electroforética en un electrolito determinado. Por el contrario, la movilidad electroforética en el análisis de proteínas viene modificada por su hidrofobicidad, secuencia primaria o conformación (Rickard *et al.*, 1991). Además, la carga de una proteína puede variar en función del pH del electrolito. Deyl *et al.* (1989) han estudiado la movilidad electroforética de proteínas de diferente

peso molecular en capilares de sílice sin tratar, con un rango de pH para el electrolito comprendido entre 6,9 y 10,5, llegando a demostrar la existencia de una relación lineal entre movilidad electroforética y pI.

Uno de los principales problemas en electroforesis capilar de proteínas usando capilares de sílice sin tratar, es la adsorción de la proteína a través de sus cargas positivas a los grupos silanol de la pared del capilar. Este mecanismo produce un ensachamiento de la banda, lo que se traduce en una eficacia pobre. Lauer y McManigill (1986) propusieron realizar la separación de una proteína con altos valores de pH del electrolito, de manera que proteína y paredes del capilar presentasen cargas negativas. A valores de pH superiores a 8,0 se genera un fuerte flujo electroosmótico (movimiento global del electrolito en el interior del capilar) que proporciona una velocidad constante de migración. Esto facilita el avance de proteínas con fuerte carga negativa, acortando así el tiempo de análisis (Chen *et al.*, 1991). Chen *et al.* (1992) emplearon como electrolito tampones de alta fuerza iónica (por ejemplo, tampón fosfato sódico 0,12 M) para mejorar así la eficacia en la separación de proteínas. En estas condiciones, la sal compite con la proteína por los sitios de adsorción sobre la pared del capilar. La única limitación es la generación de un efecto Joule intolerable para capilares con un diámetro interno superior a 75 μm . Otra alternativa es eliminar las proteínas adsorbidas mediante el lavado del capilar con disoluciones ácidas (ácido fosfórico) o básicas (hidróxido sódico) entre cada análisis, con objeto de restaurar las condiciones iniciales del capilar (Zhu *et al.*, 1990). El principal inconveniente de esta técnica es el acortamiento de la vida media del capilar.

Las proteínas también pueden ser separadas en electroforesis capilar sobre la base de su peso molecular, para lo cual se utilizan capilares rellenos de geles, como poliacrilamida (Hjerten *et al.*, 1987; Widhalm *et al.*, 1991). Estos geles, además de eliminar los efectos de carga en superficie, introducen un nuevo factor, como es el tamaño del poro creado por el gel. Igualmente, el empleo de geles de poliacrilamida con SDS como relleno de los capilares permite utilizar la electroforesis capilar para el estudio de las proteínas en condiciones desnaturalizantes, de manera similar a la electroforesis convencional con SDS (Cohen y Karger, 1987; Cohen *et al.*, 1987; Tsuji, 1991).

1.4.- ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES LIGANDO-PROTEINA

Una característica común de las proteínas es que, de forma invariable, interaccionan físicamente con otras moléculas. Una proteína nunca actúa sola, sino que siempre actúa en un entorno molecular heterogéneo. Por tanto, un punto de interés es caracterizar la interacción de la proteína con esas otras moléculas.

Además de la interacción sustrato-enzima, que determina la función de esta última, pueden encontrarse interacciones entre la enzima y moléculas reguladoras o efectoras que, de manera habitual, son estructuralmente diferentes del sustrato o de los productos de reacción. Estos efectores pueden activar o inhibir la enzima de diferentes maneras, competitiva, acompetitiva, no competitiva o mixta, en función del sitio de unión del efector a la proteína (Price y Stevens, 1986).

Diferentes métodos permiten estudiar la unión de una molécula efectora a una enzima. Uno de estos métodos se basa en la medición de los cambios producidos en el espectro ultravioleta de la enzima. Por ejemplo, la unión de Leu a α -isopropilmalato sintasa produce cambios conformacionales detectables mediante variaciones en su espectro ultravioleta. Estas variaciones se identifican como un cambio en la exposición de ciertos residuos aminoacídicos (Tyr y Trp, principalmente) en la enzima (Teng-Leary y Kohlhaw, 1973). El ligamiento de sales biliares a seroalbúmina de vaca se ha estudiado mediante fluorescencia y dicroísmo circular. La unión de las sales produce un descenso de la fluorescencia natural de la enzima a 350 nm, lo cual implica que el ligamiento se produce en un entorno próximo a los residuos Trp de la proteína. Así mismo, se han observado cambios en el espectro de dicroísmo circular (Pico y Houssier, 1989). Esta última técnica, junto con los espectros ultravioleta de la proteína, también se ha utilizado para estudiar el ligamiento de varios efectores a la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (Sono, 1989).

Todas estas técnicas son indicativas de que existe unión efector-enzima, pero por sí mismas no permiten cuantificar el número de moléculas efectoras que se unen a la proteína ni la cinética de su unión. Este tipo de estudios se realiza habitualmente mediante equilibrio de diálisis. Para ello, se utiliza un sistema bicameral, separadas ambas cámaras mediante una membrana

semipermeable. Un volumen conocido de una disolución de proteína, de concentración también conocida, se sitúa a un lado de la membrana y al otro, un volumen conocido de una disolución de ligando, de concentración también conocida. La cantidad de efector unido a la proteína se determina, una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio de diálisis, mediante la valoración del efector libre (Klotz, 1989). Los datos obtenidos a partir de estos estudios se representan, habitualmente, mediante gráficas de Scatchard (Scatchard, 1949). Cuando dicha representación gráfica proporciona una línea recta, los sitios de unión por molécula de proteína se calculan como el punto de intersección de dicha recta con el eje de abscisas. Sin embargo, numerosos casos experimentales muestran un claro alejamiento de la linealidad, produciendo curvas cóncavo-convexas, como ocurre para la unión del laurato a seroalbúmina de vaca (Pedersen *et al.*, 1986) o bien curvas parabólicas, como en la unión de Leu a α -isopropilmalato sintasa (Teng-Leary y Kohlhaw, 1973). En el primer caso, la forma cóncava se interpreta como existencia de cooperatividad negativa en la unión mientras que en el segundo, la curvatura obtenida indicaría cooperatividad positiva en el ligamiento. Los dos tipos de cooperatividad pueden ser mimetizados por diferentes artefactos (Mendel *et al.*, 1985; Ishida *et al.*, 1988; Price y Stevens, 1986), por lo que es habitual recurrir a varias, no solo a una, representaciones gráficas de los datos de ligamiento que pongan de manifiesto estos posibles artefactos (Klotz, 1989). De esta forma se determinan tanto la existencia de cooperatividad real como el número de sitios de unión en la proteína para la molécula efectora.

1.5.- ARGINASAS Y SUS ISOFORMAS

La arginasa, L-arginina amidinohidrolasa (EC. 3.5.3.1), está ampliamente distribuida en la naturaleza. Ha sido particularmente estudiada en tejidos animales, en relación con la excreción de nitrógeno y el ciclo de la urea. También se ha purificado y caracterizado en plantas, en sus semillas y en muchos microorganismos.

En la formación de semillas de leguminosas, un suceso de capital importancia es la acumulación de proteínas de almacenamiento, ricas en arginina, que serán la principal fuente de

nitrógeno para el crecimiento del eje embrionario durante la germinación (Bewley y Black, 1983). Esto implica una clara dependencia entre germinación y las enzimas del metabolismo de la arginina. Por ejemplo, la actividad arginasa incrementa (Matsubara y Suzuki, 1984) o permanece constante (De Ruiter y Kollöf, 1983) durante la germinación de semillas de soja y guisante, respectivamente. Ya que los cotiledones y el eje embrionario son metabólicamente diferentes durante el proceso, la enzima puede tener papeles metabólicos también diferentes. Pawashe y Srivastava (1987) describieron una actividad arginasa en semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) que incrementa rápidamente en los cotiledones como respuesta a la movilización de las proteínas ricas en arginina, mientras que dicha actividad desciende rápidamente en el eje embrionario durante los primeros estadios del desarrollo.

Kang y Cho (1990) purificaron y caracterizaron esta enzima a partir de cotiledones de soja (*Glycine max*). Su peso molecular era de 220 kDa, estimado por filtración a través de Sephadex G-200. La electroforesis desnaturizante de la proteína purificada dio una única banda de 55 kDa, lo que indicaba que la proteína estaba presente como un tetramero. Su K_m fue estimada en 83 mM, siendo activada por putrescina. La enzima resultó ser dependiente de Mn^{2+} para desarrollar su actividad, lo cual es una característica que se repite para todas las arginasas, independientemente de la fuente, como podrían ser hígado de rata (Kanyo *et al.*, 1992) o las arginasas codificadas por el plásmido TiC58 de *Agrobacterium* (Shrell *et al.*, 1989). La única excepción conocida resultó ser la arginasa de *Bacillus caldovelox* (Patchett *et al.*, 1991). Aunque la función del catión no está totalmente esclarecida, Green *et al.* (1990, 1991) sugirieron un doble papel catalítico y estructural para el Mn^{2+} respecto a la arginasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Maggini *et al.* (1992) describieron una arginasa presente en hígado de rata, dependiente de Mn^{2+} , para cuyo sustrato mostraba una fuerte cooperatividad positiva ($S_{0.5} = 6,5 \mu M$). Sin embargo, en ausencia de Mn^{2+} , la K_m de la enzima aumentaba hasta 21 μM , lo que indicaría un importante papel regulador del catión.

Soru (1983) estudió las propiedades químicas e inmunológicas de la arginasa de *Bacillus anthracis* y de *Staphylococcus aureus*, llegando a la conclusión de que desempeñaban funciones distintas en sus respectivos organismos. En *S. aureus* se encontraron otras enzimas del ciclo de la

urea, no así en *B. anthracis*. Respecto a esta última especie bacteriana, sus cepas patógenas eran siempre encapsuladas y, además, mostraban una elevada actividad arginasa. Por el contrario, las cepas no encapsuladas tenían niveles casi inapreciables de dicha actividad.

Rhodobacter capsulatus posee una arginasa inducible por L-arginina y L-homoarginina (Moreno-Vivian *et al.*, 1992), dependiente de Mn^{2+} pero fuertemente inhibida por Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cys y Orn. La enzima estaba formada por cuatro subunidades idénticas, de 31 kDa de peso molecular. Su K_m era de 16 mM, valor muy similar al obtenido para la arginasa de *S. cerevisiae* (Green *et al.*, 1990). Sin embargo, la enzima de esta última especie era un trímero que se encontraba formando un complejo con ornitina transcarbamilasa (Duong *et al.*, 1986; Eisenstein *et al.*, 1986). La arginasa de levadura también mostró ser una enzima sujeta a inducción nutricional por su sustrato (Whitnery y Magasaniki, 1973). Cooper *et al.* (1992), empleando diferentes mutantes de *S. cerevisiae*, demostraron la existencia de un control transcripcional de la enzima por arginina. Tanto en plantas como en microorganismos, la arginasa parece ser una enzima inducible. También son inducibles las de hígado de rata (Spolarics y Bond, 1988) e hígado humano (Ikemoto *et al.*, 1989). En *Neurospora crassa*, la arginasa está siempre presente en cantidades significativas y es activada por liberación de arginina desde la vacuola (Weiss y Davis, 1977). A este respecto, Borkovich y Weiss (1987a) describieron un aumento de actividad de hasta 3 veces sobre los niveles basales de arginasa cuando el micelio crece en un medio con L-arginina como única fuente de nitrógeno.

La estimación del peso molecular de las diferentes arginasas purificadas mediante filtración por gel o electroforesis con SDS indican que todas ellas poseen una subunidad básica, cuyo peso molecular oscila entre 30 kDa para la de hígado de rata a 55 kDa para la de soja. La enzima nativa, a su vez, podrá estar formada por un número variable de subunidades, entre 3, para la de hígado humano, y 7, para la de *N. crassa*. Ikemoto *et al.* (1990) purificaron a homogeneidad una arginasa de hígado humano a partir de cepas clonadas de *Escherichia coli*. El peso molecular de esta proteína fue estimado en 35 kDa, no aislándose en ningún caso formas poliméricas. Los autores concluyeron que este monómero debería ser la auténtica forma de arginasa, mientras que

dímeros, trímeros o tetrámeros detectados para la arginasa humana se debían a artefactos en el proceso de purificación, que favorecerían la autoasociación de la enzima.

Se ha descrito con frecuencia la aparición de isoenzimas como mecanismo regulador de ciertas rutas metabólicas. No se han descrito isoformas de arginasa en bulbos de *Iris* (Boutin, 1982), *Pisum sativum* (Talor y Stewart, 1981), en alcachofa (Wright *et al.*, 1981) o en soja (Kang y Cho, 1990). Por el contrario, se han descrito isoformas de arginasa en microorganismos y tejidos animales. Así, Borkovich y Weiss (1987a y b) describieron en *N. crassa* dos isoformas de arginasa que diferían en su peso molecular (26,8 kDa y 31,7 kDa) y que estaban inmunológicamente relacionadas con la arginasa de *S. cerevisiae*. El empleo de cepas de *Neurospora* deficientes en arginasa puso de manifiesto que ambas formas eran codificadas o reguladas por el mismo *locus* regulador, **aga** (Borkovich y Weiss, 1987b).

La variación en las propiedades de las isoformas de arginasa durante el desarrollo ha sido estudiada en tejidos fetales y adultos humanos, encontrando diferencias en sus propiedades inmunológicas; sin embargo poseen idéntica K_m , termoestabilidad, requerimiento de cationes para su actividad y ambas son inhibidas por ornitina (Spector *et al.*, 1982). En riñón de rata, Skrzypek-Osiecka *et al* (1983) estudiaron dos isoenzimas de arginasa, A₁ o citoplásmica y A₂ o mitocondrial, concentrando esta última el 98% de la actividad total. Las dos formas se diferenciaban en sus propiedades inmunológicas y electroforéticas. Sin embargo, las arginasas de hígado y eritrocito humano eran similares en cuanto a peso molecular y propiedades inmunológicas (Ikemoto *et al.*, 1990).

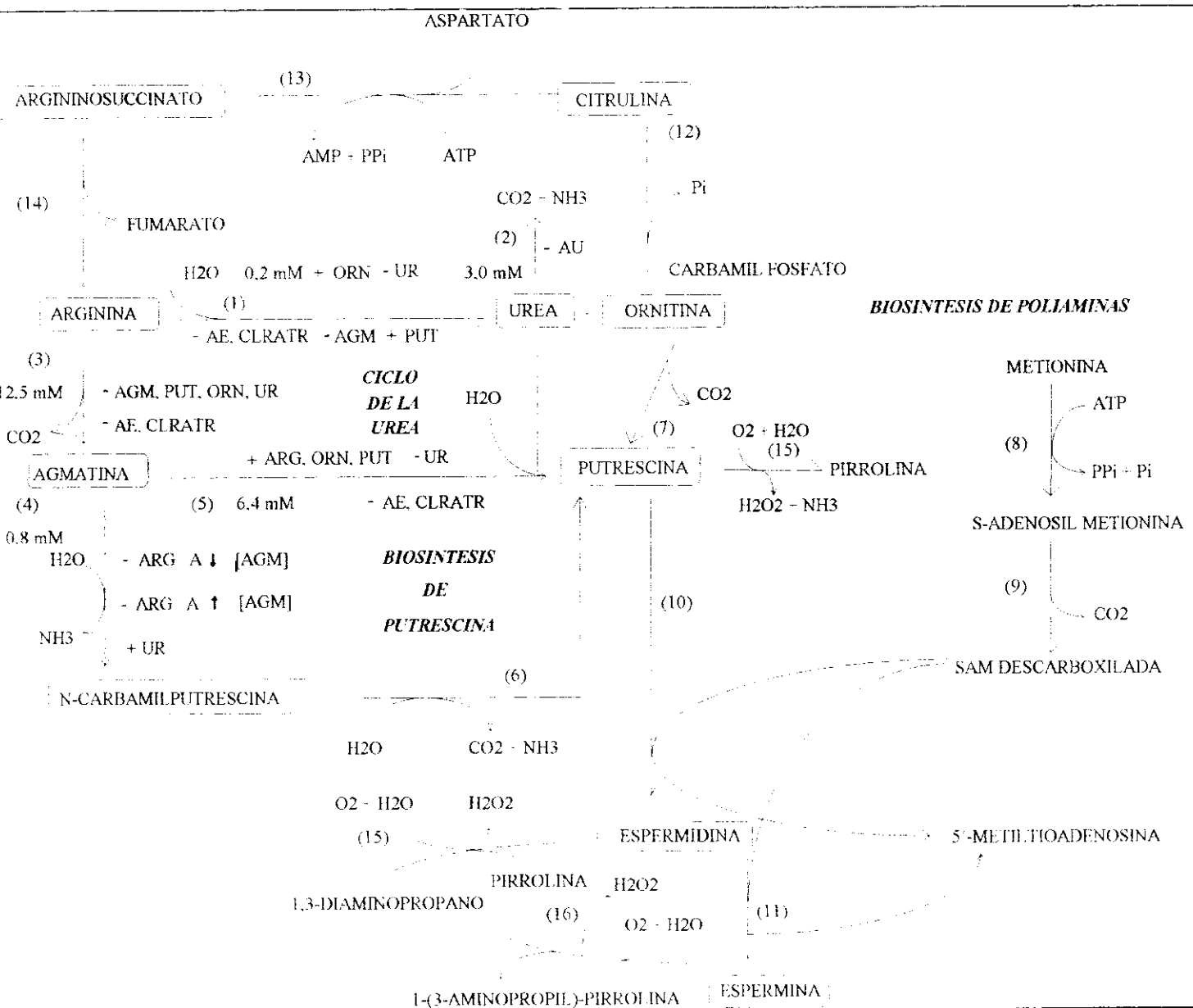
Spolarics y Bond (1988) detectaron dos formas de arginasa en el citosol de células de hígado de ratón que se diferenciaban en su peso molecular (35 kDa y 38 kDa, respectivamente) y en su punto isoelectrónico (7,8 y 5,8). La proteólisis limitada con tripsina eliminaba un fragmento de aproximadamente 3 kDa que no afectaba a la actividad o al pI de la isoforma. La composición de aminoácidos de las dos formas era similar (\sim 87% de homología) a las arginasas de hígado de rata y humano. Los autores relacionaron la aparición de varias isoformas de diferente tamaño y carga en hígado de rata con la función de la enzima en diferentes rutas metabólicas: ciclo de la urea, síntesis de prolina o ácido glutámico o síntesis de poliaminas, ya que estas rutas deberían ser

independientemente reguladas. La existencia de isoformas implica la posibilidad de regular arginasa bajo diferentes condiciones fisiológicas o patológicas, ya que también se han detectado cambios en estados iniciales de diabetes o hiperargininemia.

1.6.- CATABOLISMO DE LA ARGININA EN LIQUENES

Para los líquenes que contienen cianobiontes, glutamato y glutamina son los productos primarios de asimilación del nitrógeno (Rai, 1988). Sin embargo, los líquenes que contienen un alga verde acumulan grandes cantidades de arginina (*Evernia prunastri*) mientras que otras especies (*Rocella montagnei*, *Cladonia rangiferina*, *C. gracilis*, *Parmelia tinctorum*, *P. nepalensis*) acumulan Glx y Asx como los más abundantes en el conjunto de aminoácidos libres (Vicente y Legaz, 1988b), aunque el contenido en arginina suele ser también alto. La abundancia relativa de cada uno de los aminoácidos de este conjunto está sometida a variaciones estacionales (Legaz *et al.*, 1986).

A continuación se muestra un esquema sobre las diferentes rutas del catabolismo de arginina en *E. prunastri*.



- 1.- arginasa
 - 2.- ureasa
 - 3.- arginina descarboxilasa
 - 4.- agmatina iminohidrolasa
 - 5.- agmatina amidinohidrolasa
 - 6.- n-carbamil putrescina amidohidrolasa
 - 7.- omitina descarboxilasa
 - 8.- s-adenosilmetionina sintasa
 - 9.- s-adenosilmetionina descarboxilasa
 - 10.- espermidina sintasa
 - 11.- espermina sintasa
 - 12.- omitina transcarbamilasa
 - 13.- arginino-succinato sintasa
 - 14.- arginino-succinato liasa
 - 15.- diamino oxidasa
 - 16.- poliamina oxidasa
- AE: ácido evémico
 AGM: agmatina
 ARG: arginina
 AU: ácido úsnico
 CLRATR: cloroatranorina
 ORN: ornitina
 PUT: putrescina
 SAM: S-adenosil metionina
 UR: urea
 + : activación
 - : inhibición

1.6.1.- Arginasa y ornitina descarboxilasa.

Los estudios sobre el contenido en poliaminas de varias especies de líquenes indican que la arginina es rápidamente metabolizada tras la hidratación del talo. La hidrólisis de arginina por arginasa produce ornitina y urea. La enzima es inducida por su sustrato en *E. prunastri* en oscuridad (Legaz y Vicente, 1980), aunque también se detecta actividad tras la incubación en luz. La adición de urea a los medios de cultivo previene, o disminuye, la inducción de arginasa causada por el aminoácido. Una arginasa purificada 158 veces (peso molecular 180 kDa) muestra un valor de K_m para arginina de 0,2 mM. El pH óptimo de la reacción es bimaximal, con un pico principal a pH 9,0 y un máximo secundario a pH 6,5 (Legaz y Vicente, 1982). La urea se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima, con un valor de K_i de 2,58 mM, mientras que la agmatina se comporta como inhibidor no competitivo, con una K_i de 21,54 mM. Ornitina y putrescina son activadores de la enzima, mientras que la fuerte inhibición producida por urea debe interpretarse como un mecanismo de retroinhibición que asegura una completa y efectiva regulación de la actividad arginasa (Vicente y Legaz, 1983).

Una segunda forma de arginasa, ésta constitutiva, está presente en talos de *E. prunastri*. La proteína, pre-existente e inactiva, es activada por la liberación de la arginina, probablemente secuestrada en las vacuolas, al citosol tras la hidratación de los talos. La enzima ha sido purificada 920 veces a partir de talos incubados sobre cicloheximida para evitar la aparición de la forma inducible. Su peso molecular es de 330 kDa. Las curvas de saturación por sustrato muestran una cinética típicamente miceliana con un valor de K_m para arginina de 2,5 mM (Martín-Falquina y Legaz, 1984). Ornitina, agmatina y putrescina se comportan como activadores no esenciales de la enzima. Los valores de K_a aparente, estimados mediante la representación de Dixon, son 1,1 mM para ornitina, 5,88 mM para agmatina y 2,7 mM para putrescina. La arginasa constitutiva, así como la inducible, requieren específicamente Mn^{2+} como cofactor. La contaminación con arginasas bacterianas ha sido descartada en ambos casos, ya que incubaciones en presencia de penicilina rebajan enormemente el número de bacterias vivas sin afectar la actividad arginasa recuperable (Vicente y Legaz, 1988a).

Los fenoles liquénicos mayoritarios en los extractos libres de células correspondientes a cada una de las formas de arginasa descritas muestran ser activadores de sus correspondientes arginasas en los rangos de concentración fisiológicos (Legaz, 1991). Dado que algunas de estas activaciones producen un incremento aparente en el valor de h , por ejemplo, de 1,0 a 1,7 para la arginasa de inducible, la hipótesis de diferentes formas poliméricas va tomando carta de naturaleza, siendo posiblemente los fenoles accesibles a la enzima citosólica los responsables de tal polimerización (Legaz, 1991).

Ornitina, uno de los productos de hidrólisis de arginina, puede ser posteriormente descarboxilada para producir putrescina y urea. Escribano y Legaz (1984) encontraron actividad ornitina descarboxilasa en talos de *E. prunastri* incubados sobre ornitina en oscuridad. La enzima era también detectable cuando los talos se incubaban sobre tampón Tris-HCl, aunque la actividad final desarrollada era 2,5 veces menor que la encontrada tras la incubación sobre el aminoácido. La adición de cicloheximida 40 μ M a los talos cultivados sobre ornitina no anula la actividad descarboxilasa. Sin embargo, cloranfenicol 0,1 mM provoca una pérdida del 95% de la actividad descarboxilasa. Por ello, los autores especulan acerca de la existencia de dos enzimas, una de síntesis citosólica y otra organular. Aproximadamente el 80% de la actividad descarboxilasa total depende de la proteína sintetizada en orgánulos.

1.6.2.- La vía descarboxilativa de la arginina.

Una vía alternativa a la hidrólisis de la arginina es su descarboxilación para producir agmatina. Talos de *E. prunastri* incubados sobre arginina 40 mM en oscuridad desarrollan una actividad arginina descarboxilasa inducible, aunque dicha actividad comienza a decrecer a las 4h de incubación. Vicente y Legaz (1981) purificaron esta enzima 117 veces. Su pH óptimo es 7,1 y su temperatura óptima, 26°C. La masa molecular de esta proteína se ha estimado en 300 kDa. La cinética de saturación por sustrato indica que se trata de una enzima micaliana cuyo valor de K_m ha sido estimado en 12,5 mM para arginina. Por ello, a nivel de afinidad por el sustrato, parece más efectiva la vía hidrolítica que la descarboxilante. Putrescina y urea inhiben significativamente

la descarboxilasa, lo que sugiere un posible mecanismo regulador de actividad por retroinhibición. La agmatina, que era un potente inhibidor de arginasa, sólo muestra en este caso una moderada acción inhibitoria de la descarboxilasa.

La agmatina producida por descarboxilación de la arginasa puede ser hidrolizada por una agmatina amidinohidrolasa para dar putrescina y urea. Una enzima purificada 485 veces de talos de *E. prunastri* muestra un pH óptimo de 6,9, y temperaturas óptimas entre 35°C y 40°C, aunque a 0°C se mantiene un 6% de la actividad máxima de la preparación purificada, así como un 20% a 70°C. La masa molecular de esta enzima ha sido estimada en 320 kDa. A partir de la representación de Woolf, el valor de K_m calculado para la agmatina es de 6,4 mM (Vicente y Legaz, 1982). La enzima muestra especificidad por agmatina y no hidroliza arginina, ornitina o putrescina. Estos últimos tres análogos se comportan como activadores de la hidrolasa para concentraciones de agmatina menores de 14 mM, pero para valores más altos, los tres compuestos se comportan como inhibidores de la enzima. La urea inhibe completamente la actividad agmatina amidinohidrolasa.

La agmatina producida por acción de una arginina descarboxilasa puede ser también convertida en N-carbamil putrescina por acción de una agmatina iminohidrolasa. Esta vía, que fue descrita para plantas superiores como *Hordeum vulgare*, *Zea mays* and *Glycine max*, ha sido también encontrada en talos de *E. prunastri* incubados durante 2h en tampón Tris-HCl. No obstante, la adición de arginina soporta un fuerte incremento de actividad hasta las 4h de incubación. La aparición de actividad hidrolasa era dependiente de la síntesis actual de proteínas. Tal hidrolasa fue purificada 34,5 veces, obteniéndose un valor de K_m para agmatina de 0,8 mM. La urea se comporta como un activador de la enzima mientras que arginina inhibe la hidrolasa para concentraciones de agmatina superiores a 4 mM. Para concentraciones de sustrato inferiores a 2 mM, arginina se comporta como un activador de la enzima (Legaz *et al.*, 1983).

1.6.3.- Síntesis y translocación de poliaminas.

Sobre la base de los pH óptimos para las enzimas clave del metabolismo biosintético de la putrescina, se han establecido dos rutas principales, una alcalina, fúngica, que parece ser mayoritaria, y otra, neutra, algal y minoritaria (Legaz, 1985, 1991). *E. prunastri* sintetiza putrescina, espermidina y espermina, siendo la espermidina el compuesto que se encuentra siempre en mayores cantidades en talos recién recolectados. Valores ácidos de pH (5,5) producen un descenso en la cantidad de putrescina y espermina tanto libres como conjugadas, mientras que los niveles de espermidina permanecen prácticamente inalterados, al menos tras 8 h de incubación de los talos a este pH. En estas condiciones, la putrescina es la única poliamina segregada a los medios de incubación. Valores neutros de pH permiten una lenta pero constante y significativa producción de putrescina y favorecen la conjugación con macromoléculas tanto de putrescina como de espermina. A estos valores de pH, la secreción de las tres poliaminas al medio es promovida, principalmente como formas libres. Los niveles de poliaminas libres en talo permanecen estables a valores de pH en el rango de la alcalinidad, mientras que disminuye marcadamente la conjugación de putrescina y espermina a pequeñas moléculas. En estas condiciones, la principal poliamina segregada a los medios de incubación resulta ser la espermidina (Escribano, 1991).

Las poliaminas en líquenes parecen estar envueltas en la regulación del crecimiento del talo, viabilidad de los fotobiontes y en la estabilidad del equilibrio de la simbiosis (Escribano y Legaz, 1985; Legaz, 1985; Legaz *et al.*, 1985). Aunque ambos simbiontes pueden sintetizar putrescina (Legaz, 1985), sólo un 0.6% de la diamina total suministrada de forma exógena a talos de *E. prunastri* es posteriormente localizada como putrescina libre en el ficobionte. Esto parece indicar que las algas controlan el influjo de la poliamina quizá como un mecanismo de defensa frente a los efectos tóxicos de la diamina sobre su metabolismo (Vicente y Legaz, 1983). Esto está de acuerdo con la hipótesis según la cual la putrescina, cuando es producida por el micobionte, o se mueve hacia él, va a ser conjugada en un alto porcentaje (Escribano and Legaz, 1988). Por otra parte, se ha demostrado que cuando talos de *E. prunastri* son incubados en

medios líquidos a pH 5.0 (Legaz and Escribano, 1987), la putrescina diprotonada es atrapada en la pared celular y allí puede ser, en parte, degradada a 1-pirrolina, antes de su entrada en la célula, por acción de una diamino oxidasa segregable.

Recientemente se ha identificado y caracterizado parcialmente un sistema de transporte para putrescina en talos de *E. prunastri* midiendo el consumo de putrescina marcada radiactivamente (Legaz *et al.*, 1993a). La captación de la diamina muestra ser independiente de la temperatura y alcanza su máximo valor para pH alcalinos. Los valores de K_m y v_{max} para el transporte de putrescina en estas condiciones experimentales son 5.3 mM y 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. No se ha observado ningún efecto sobre el transporte y la adsorción al tratar los talos con algunos inhibidores metabólicos, como cianuro sódico y 2,4-dinitrofenol, así como con el fungicida nistatina. Esto sugiere que la captación de putrescina es independiente de energía, muy rápida y mediada por un transportador. La putrescina transportada queda principalmente localizada en el citosol y alrededor del 65% de la putrescina total captada se encuentra en las células del micobionte.

De igual forma, se ha estudiado la posibilidad de competición de este sistema de transporte con otros metabolitos. Los experimentos de competición para la captación incluyen tanto transporte como adsorción sobre paredes celulares (Escribano *et al.*, 1993). En este sentido espermidina y espermina se comportan como inhibidores competitivos del sistema de transporte de putrescina con valores de K_i de 1.55 mM y 1.34 mM, respectivamente. Los aminoácidos básicos, como arginina, ornitina y lisina, no compiten por el mismo sitio de adsorción. La putrescina captada no parece ser convertida eficientemente en otras poliaminas después de su transporte. Estos resultados sugieren que la movilidad de putrescina dentro del talo está primada hacia el micobionte.

1.6.4.- La función de la arginasa segregable.

No existe, hasta la actualidad, ningún trabajo experimental que aporte resultados sobre secreción macromolecular en líquenes en condiciones naturales. Sin embargo, la experimentación

llevada a cabo en condiciones de laboratorio, mediante la cual se intenta estudiar las características bioquímicas de síntesis de material preferentemente enzimático, utiliza a menudo cultivos de talo sobre medios líquidos durante cortos periodos de tiempo. En estas condiciones, se ha observado secreción de algunas actividades enzimáticas, aunque el papel fisiológico que tal secreción pueda tener es materia sujeto de controversia.

Cada vez son más las proteínas extracelulares que, tras su análisis bioquímico, aparecen glicosiladas con una cantidad variable de carbohidratos unidos covalentemente a la secuencia polipeptídica. La glicosilación primaria se realiza a su paso por la membrana del retículo endoplásmico, topográficamente muy cerca del punto de unión del ribosoma a la membrana. La síntesis del enlace covalente depende del reconocimiento de una secuencia particular de aminoácidos. Las glicosilaciones subsecuentes son catalizadas por enzimas particuladas en la membrana, siendo la secuencia final de monosacáridos, regida por la especificidad de cada enzima por el nucleótido de azúcar y el aceptor. Detecciones citoquímicas del proceso completo confirman que la formación del oligosacárido inicial ocurre en el retículo endoplásmico rugoso mientras que las restantes adiciones se realizan al paso de la proteína por el resto de las membranas y dentro de las vesículas de Golgi, que actuarán después como vesículas secretoras (Priest, 1987). La secreción de glicoproteínas debe ser mirada, entonces, como un mecanismo de pinocitosis reversa (Winterburn y Phelps, 1972). Glicosilación como señal de secreción no sólo afecta a proteínas enzimáticas. La existencia y función de proteínas glicosiladas, producidas por los fotobiontes de *E. prunastri* y *Pseudevernia furfuracea*, que actúan como proteínas represoras sin actividad enzimática conocida, ha sido recientemente demostrada (Pérez-Urria *et al.*, 1989a; Rodríguez *et al.*, 1989).

En todos los casos, las enzimas segregadas por líquenes parecen ser formas modificadas de una enzima inducible. Cuando se hacen flotar talos de *E. prunastri* sobre urea, la ureasa es inducida y, después de esto, una parte de dicha ureasa es segregada al medio como una función inversa de la cantidad de enzima retenida por el talo (Blanco *et al.*, 1984; Vicente y Blanco, 1985). Cuando la producción de la enzima es inhibida por cicloheximida, un inhibidor de la traducción en ribosomas 80S, la secreción de la enzima es inmediatamente anulada (Vicente y

Pérez-Urria, 1989). La misma especie de líquen produce, al menos, dos formas de arginasa citosólica, siendo una de ellas constitutiva mientras que la otra se comporta como inducible por arginina (Legaz y Vicente, 1982). Simultáneamente, se ha podido verificar la existencia de actividad arginasa en los medios de incubación de los talos. Pues bien, el análisis del peso molecular de la arginasa segregada indica claramente que la enzima inducible es la única forma recuperada como enzima extracelular (Planelles y Legaz, 1987). La enzima muestra ser una glicoproteína que contiene 280 residuos de glucosa, 27 de fructosa y 85 de manosa por molécula de proteína. El heteroglicopolímero tiene un peso molecular de 65 kDa (Planelles y Legaz, 1987) por lo que el peso molecular de la glicoproteína se ha estimado en 245 kDa. El valor de K_m para esta enzima ha sido estimado en 1,5 mM para L-arginina, mientras que la de la enzima citosólica soluble es 0.2 mM. En este caso, la glicosilación implica una pérdida en la afinidad de la enzima por su sustrato.

Es interesante describir que pueden establecerse buenas correlaciones entre el contenido hídrico relativo del talo y la secreción de ureasa para dos especies diferentes de líquenes que crecen sobre el mismo sustrato. Por ejemplo, *Cetraria nivalis* segrega mayor cantidad de ureasa que la encontrada segregada de *Stereocaulon paschale*, creciendo ambas sobre podzol. *Cladonia stellaris*, creciendo sobre un suelo mineral, satura su talo alcanzando muy altos valores de contenido hídrico relativo y segrega ureasa de forma continua. Por el contrario, *C. rangiferina* no segrega la enzima mientras que, paralelamente, necesita muy bajas cantidades de agua para alcanzar la saturación del talo (Pérez-Urria *et al.*, 1989).

Usando tres diferentes ecotipos de *Xanthoria parietina*, Rodríguez y Vicente (1991) intentaron correlacionar secreción de ureasa con contenido relativo de agua después de una inmersión durante 15 min antes del suplemento de urea. De esta manera se estableció una relación lineal entre ureasa segregada y contenido relativo de agua para los tres ecotipos usados (Legaz y Vicente, 1991). Por otra parte, la secreción de urea por talos de *Mastodia tesellata* es drásticamente abolida cuando la inmersión del talo se realiza en una mezcla de agua:polietilenglicol (50:50, v/v). En estas circunstancias, el contenido hídrico relativo de los talos es inferior al 40% del observado cuando dichos talos se sumergen en agua o en una disolución 40

mM de urea, relacionándose entonces la ausencia de secreción con la insaturación de agua del talo en estas condiciones. Por todo ello, parece razonable relacionar secreción de ureasa con el estado hídrico de los talos, siendo éste un reflejo de la cantidad de agua contenida por las células y en los espacios intercelulares y concluir que la secreción sería una consecuencia del movimiento de las enzimas en el talo, desde un simbiote a otro, saliendo la proteína de aquel a través del *continuum* espacio intercelular hidratado-medio líquido externo (Vicente, 1990; Vicente y Legaz, 1988a).

La posibilidad de movimiento de enzimas entre simbioses puede tener importantes implicaciones metabólicas, aún sin excluir que ambos simbioses puedan sintetizar la misma enzima a tiempos de inducción diferentes (Ahmadjian, 1977; Vicente y Legaz, 1988b; Vicente y Pérez-Urria, 1989). También es particularmente interesante el que estas enzimas, de forma transitoria (Vicente y Pérez-Urria, 1989) o permanente (Legaz y Vicente, 1989), puedan ser localizadas en las paredes celulares de los ficobioses. Las interacciones proteína-proteína en las paredes celulares de los ficobioses líquénicos han sido, desde antiguo, relacionadas con sistemas de reconocimiento de ficobioses compatibles (Lockhart *et al.*, 1978; Bubrick *et al.*, 1981; Bubrick *et al.*, 1982; Bubrick *et al.*, 1985). Ahora bien, existía un hecho particularmente curioso. Cuando se usaba una proteína de reconocimiento, producida por el hongo de *X. parietina*, marcada con un trazador fluorescente, sólo se unía a su ficobionte compatible cuando éste procedía de un cultivo axénico, nunca cuando había sido recientemente aislado del talo (Bubrick y Galun 1980). Una conducta semejante era observada para el ligamiento de lectinas comerciales sobre diferentes especies de ficobioses (Marx y Peveling, 1983) mantenidos en cultivo axénico durante largos periodos. Esto parecía indicar que el receptor de pared era una glicoproteína, inducida en cultivo y probablemente reprimida en el holobionte (Vicente y Legaz, 1992). Recientemente, Molina *et al.* (1993) han demostrado que una lectina parcialmente purificada de *X. parietina*, que contiene una arginasa glicosilada (susceptible de ser segregada), es capaz de unirse a las paredes celulares de ficobioses compatibles recientemente aislados del talo si son mantenidos durante sólo 2h en una disolución de urea. Simultáneamente a la unión, tanto la ureasa particulada en las paredes del alga, como una actividad arginasa detectada en la preparación de lectina son completamente anuladas. Esto está de acuerdo con el hecho de que

muchas lectinas hayan sido identificadas como glicoproteínas con actividad enzimática (Shannon and Hankins 1981), lo que podría relacionarse con la hipótesis de que el verdadero papel de estas lectinas no sería el de reconocimiento de especies compatibles (Lerouge *et al.* 1990), sino un mecanismo de defensa de la planta frente a potenciales parásitos (Chrispeels and Raikhel 1991, Franz 1990), incluidos, en el caso de los líquenes, los propios micobiontes (Ahmadjian 1987). La putrescina ha sido claramente relacionada con el grado de infectividad fúngica (Rajam *et al.* 1985; West y Walters, 1989)) y en el caso de los líquenes, la arginasa fúngica segregable, cuando penetra en ficobiontes aislados, desorganiza el cloroplasto y produce degradación de clorofilas en paralelo al aumento del nivel de putrescina en el ficobionte (Molina y Vicente, 1993), cuyo contenido natural es bajo, derivado de la vía neutra del catabolismo de la arginina (Legaz, 1991).

Aún la posibilidad de interacción de esta arginasa segregable con los fenoles existe, dado que muchos de ellos cristalizan de forma normal sobre las paredes celulares de los fotobiontes liquenizados, como ha sido demostrado por Ahmadjian y Jacobs (1985) para *Usnea strigosa* y por Honegger (1986) para diferentes especies de *Parmeliaceae*.

1.6.5.- Isoformas como factores de desarrollo o de regulación metabólica.

La situación metabólica descrita hasta este punto se revela como extraordinariamente compleja. Por una parte, la mayoría de los líquenes son plantas adaptadas a condiciones de extrema sequedad, por lo que la rehidratación de sus células y de sus espacios intercelulares queda restringida a muy pocas horas, a veces incluso minutos, al día (Blum, 1973). Esto condiciona la solubilización de arginina, la inducción de arginasa y su secreción, a periodos de tiempo muy restringidos. La síntesis y secreción de fenoles viene también condicionada por otro factor externo, como es la densidad de flujo fotónico incidente sobre el córtex (Fahselt, 1981). Quizá por ello, enzimas que juegan un papel decisivo en el metabolismo del nitrógeno y en el mantenimiento del equilibrio simbiótico responden a las variaciones en las circunstancias ambientales mediante la producción de isoformas (modificaciones post-traduccionales) antes que de auténticos isoenzimas (multiplicidad debido a causas genéticas), de acuerdo con Rider y Taylor

(1980). En este sentido, la formación de agregados poliméricos de ciertas enzimas, con la consiguiente modulación de su actividad, parece ser un mecanismo rápido de adaptación metabólica en líquenes (Vicente y Legaz, 1988a). A nivel genético, la opción de la represión catabólica parece ser la preferida en los sistemas rápidos de regulación. El descenso en la velocidad de respiración causada por la desecación, o el incremento en la intensidad de luz recogida por el talo, puede aumentar el contenido celular en glucosa (Tapper, 1981), lo que redundaría en mecanismos de represión catabólica que afectan, tanto a arginasa y otros enzimas biosintéticos de poliaminas (Legaz y Vicente, 1991b; Vicente y Legaz, 1985), como a enzimas del metabolismo de los fenoles (Herrero *et al.*, 1989; Legaz *et al.*, 1992).

Las investigaciones acerca de las relaciones entre variabilidad alélica y genotípica y los factores externos, bióticos y abióticos, han sido realizadas frecuentemente utilizando diferentes plantas (Anderson, 1991; Samuel *et al.*, 1991) y animales (Gilbert y Richmond, 1982; Oakeshott *et al.*, 1982; David *et al.*, 1989). No obstante, estas investigaciones han sido llevadas a cabo utilizando especies de fácil reproducción en condiciones de laboratorio, en orden a realizar análisis genéticos. Por esto, los líquenes han sido excluidos hasta ahora de este tipo de investigaciones, ya que la batería enzimática está, salvo casos, localizada en ambos simbioses (Fahselt, 1985; Legaz y Vicente, 1981; Vicente y Legaz, 1988b) y, además, porque ha sido imposible hasta la fecha llevar a cabo experimentos de cruzamiento mendeliano usando especies de líquenes. Culberson *et al.* (1988) intentaron resolver este problema por medio de hibridaciones entre algunas especies de *Cladonia* en cultivos resintetizados y el análisis subsecuente de los fenoles producidos por el híbrido. No obstante, el flujo genético no pudo ser más que supuesto. Alternativamente, el análisis de los zimogramas obtenidos mediante el uso de técnicas electroforéticas produce información isozimática de la que deriva algún conocimiento evolutivo (Gottlieb, 1977). De esta forma, Fahselt (1987) encontró diferencias genéticas estudiando parámetros electroforéticos para esterasas y fosfatasa alcalinas que podrían ser explicados mediante recombinación meiótica entre *loci* polimórficos en una determinada población.

Varios sistemas enzimáticos han sido estudiados mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (Hageman y Fahselt, 1986a; Killias *et al.* 1988; Skults *et al.*, 1990) en orden a

obtener información sobre variabilidad enzimática como una función de diferencias temporales (Hageman y Fahselt, 1986a y b) y geográficas o climáticas (Fahselt, 1986). En relación con estas últimas, se ha demostrado que el patrón de bandeo para una enzima particular puede ser único para determinadas especies de líquenes (MacFarlane *et al.*, 1983; Kershaw *et al.*, 1983; Fahselt y Hageman, 1983) mientras que se encontraba variabilidad suficientemente significativa entre diferentes poblaciones de una sola especie de líquen geográficamente separadas (Hageman y Fahselt, 1984, 1986a y b). Sin embargo, en ninguno de los casos descritos se ha investigado el origen de las diferentes isoformas encontradas.

OBJETIVOS

Estudiar la multiplicidad de la arginasa de *Evernia prunastri* y caracterizar a nivel bioquímico las diferentes isoformas

Dada la relación biogénica entre actividad arginasa y síntesis de fenoles, determinar el papel efector de estas moléculas y si existe especificidad de forma.

Aclarar el anterior punto, estudiar los mecanismos de regulación de arginasa por los fenoles a nivel de actividad y de estructura.

Determinar las pautas de ligamiento del efector a la isoforma y los cambios conformacionales que ello conlleve.

A la vista de los resultados obtenidos, tratar de construir una hipótesis coherente y comprobable que relacione la funcionalidad bioquímica con su proyección fisiológica.

II.- MATERIAL Y METODOS



Figura 1.- *Evernia prunastri* (L.) Ach., líquen epífito

II.1.- MATERIAL VEGETAL

El material vegetal objeto del presente trabajo fue el liquen epífito *Evernia prunastri* (L.) Ach., recogido de la corteza de *Quercus pyrenaica* Lam. en Valsain (Segovia). Los talos, secos en corriente de aire, se almacenaron en oscuridad a 7°C, hasta su utilización, durante un período nunca superior a un mes. En la Figura 1 se muestra un ejemplar de esta especie.

II.2.- CONDICIONES DE INCUBACION

Muestras de 1,0 g de talo seco fueron sumergidas en 25 ml de disoluciones tamponadas con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 (Merck), conteniendo L-arginina 40 mM (Sigma Chem. Co.) o, cuando se indique, cicloheximida 40 μ M (Sigma Chem.Co.), y mantenidas en oscuridad a 26°C durante diferentes tiempos de incubación.

II.3.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD ARGINASA

La actividad arginasa se valoró mediante el método de Greenberg (1955), modificado por Legaz y Vicente (1980), incluyendo ureasa cristalina tipo III (Sigma Chem. Co.) en las mezclas de reacción. Dichas mezclas contenían, en un volumen final de 3,0 ml: 10 μ moles de tampón Tris-HCl, pH 9,1, para las muestras incubadas en L-arginina 40 mM o bien pH 6,5 para las muestras que fueron incubadas en cicloheximida 40 μ M; 0,5 μ moles de L-arginina; 7,5 μ moles de ácido maléico; 5,0 μ moles de sulfato de manganeso; 33,8 mg de ureasa cristalina y 20,0 μ g de proteína líquénica.

Como control se utilizaron las mismas mezclas de reacción en las cuales el sustrato (L-arginina) era sustituido por igual volumen del tampón correspondiente.

La reacción se llevó a cabo a 30°C y fue detenida tras 25 min (tiempo determinado como óptimo), mediante la adición de K₂CO₃ saturado. Después se dejaron transcurrir 2 h para completar la difusión del amonio formado y posterior fijación sobre H₂SO₄ 0,02 N, según el método de microdifusión de Conway (1962).

La valoración del amonio se llevó a cabo utilizando el reactivo de Nessler (Standard Methods, 1955) midiendo el color desarrollado a 440 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM-2. La absorbancia así obtenida se transformó en μ moles de amonio mediante una recta patrón construida a partir de concentraciones crecientes de sulfato amónico químicamente puro.

Una unidad de actividad específica fue definida como 1,0 μ mol de amonio producido por mg de proteína y por minuto.

II.4.- VALORACION DE PROTEINAS

La valoración de proteínas, tanto en el extracto libre de células como en las distintas fracciones del proceso de purificación, se llevó a cabo mediante el método de Lowry et al. (1951). El patrón fue en todos los casos seroalbúmina bovina de Sigma Chem.Co.

II.5.- PURIFICACION DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

II.5.1.- Isoformas I y II de arginasa

II.5.1.1.- Obtención del extracto libre de células

Muestras de 50 g de talo seco se incubaron en 1.250 ml de una disolución de L-arginina 40 mM, tamponada con Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, durante 6 h, a 26°C en oscuridad.

Tras la incubación, los talos se lavaron con agua destilada y se secaron ligeramente con papel de filtro. Después, se maceraron con acetona (15 ml por g de talo) durante 5 min con objeto de eliminar los fenoles corticales. Los homogeneizados fueron filtrados y los residuos se secaron en corriente de aire. Una vez secos, fueron nuevamente macerados con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (12 ml por g de talo), conteniendo sulfato de manganeso 0,5 mM y ácido maléico 0,75 mM (Greenberg, 1955). Los homogeneizados se centrifugaron durante 20 min a $24.000 \times g$ en una centrífuga Beckman J2-21 (rotor JA 21). Los sobrenadantes se recogieron y filtraron a través de un filtro Millipore GS (0,22 μ m de diámetro de poro). La temperatura durante todo el proceso

fue de 4°C. El filtrado se utilizó como extracto libre de células y en él se valoró la actividad arginasa y la cantidad de proteínas, de acuerdo a lo descrito en los apartados II.3 y II.4, respectivamente.

II.5.1.2.- Precipitación con sulfato amónico

El extracto libre de células se precipitó con sulfato amónico a distintos porcentajes de saturación, entre el 10% y el 95% (p/v). El sobrenadante del 85% resultó contener la mayor parte de la actividad arginasa. La sal se fue disolviendo en condiciones de agitación suave con protección de hielo fundente. Una vez disuelta completamente, el extracto se mantuvo dos horas más en agitación para, posteriormente, ser almacenado durante un período no inferior a 2 h. Por último, se centrifugó durante 1 h a $43.000 \times g$.

El precipitado obtenido tras la centrifugación fue resuspendido en un volumen igual al del sobrenadante. Ambas fracciones, sobrenadante y precipitado, se dializaron frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, renovando el baño cada 4 h hasta la completa eliminación de sulfato amónico (72 h aproximadamente). La temperatura durante todo el proceso fue de 4°C.

En los extractos dializados se valoró la actividad arginasa y la cantidad de proteínas (apartados II.3 y II.4, respectivamente).

II.5.1.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico

De las dos fracciones resultantes de la precipitación con sulfato amónico, se escogió el sobrenadante, por contener la mayor actividad arginasa.

La proteína del dializado fue adsorbida sobre gel de fosfato cálcico (Legget-Bailey, 1967) preparado en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, en la proporción de 100 mg de gel seco por cada mg de proteína del extracto, mediante agitación fuerte durante 2 h. Posteriormente se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 7 min. El precipitado de esta centrifugación, que contenía la mayor parte de la proteína, era resuspendido, mediante agitación, en tampón Tris-HCl 0,02 M, pH 9,1. Tras 1 h de agitación, se dejaba reposar y después se centrifugaba, en las mismas condiciones, con objeto

de desorber la proteína. El proceso se repitió sucesivas veces empleando molaridades crecientes del mismo tampón (entre 0,04 M y 3,0 M). El sobrenadante de cada centrifugación era filtrado por papel Whatman n° 1 y en él se valoraban tanto la actividad arginasa como la cantidad de proteínas (apartados II.3 y II.4, respectivamente). La temperatura durante todo el proceso fue de 4°C.

II.5.1.4.- Electroenfoque en columna

Las fracciones en las cuales se recuperó la mayor actividad arginasa fueron electroenfocadas en una columna LKB 8100 de Pharmacia. El gradiente de pH se preparó con anfolitas (Servalyte) al 1% (p/v) en un rango comprendido entre pH 3,5 y 10,0.

Para prevenir movimientos de convección no deseados o el mezclado de diferentes fracciones de proteína próximas, el gradiente de pH se estabilizó con otro gradiente de densidad de sacarosa. La muestra se introdujo al mismo tiempo que las disoluciones de llenado de la columna. La temperatura fue de 4°C y el voltaje aplicado de 1.000 V durante 48 h, tiempo al cabo del cual, la muestra estaba electroenfocada (carga neta = 0).

Se recogieron fracciones de 2,0 ml que fueron filtradas a través de una columna de Sephadex G-25 (40 mm de longitud × 10 mm d. i.) (Pharmacia) con objeto de eliminar las anfolitas presentes en cada fracción, así como el exceso de sacarosa. En cada una de las fracciones filtradas, se midió el pH y el contenido de proteínas. Aquellas fracciones que contenían proteína fueron dializadas frente a tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, durante 24 h para eliminar los restos de anfolitas y sacarosa que pudiesen quedar y, posteriormente, se valoró en ellas la actividad arginasa y la cantidad de proteínas, según lo descrito en los apartados II.3. y II.4., respectivamente.

II.5.2.- Isoforma III de arginasa

II.5.2.1.- Obtención del extracto libre de células

Muestras de 50 g de talo seco se incubaron en 1.250 ml de una disolución de cicloheximida 40 μ M, tamponada con Tris HCl-10 mM, pH 9,1, durante 16 h, a 26°C en oscuridad.

A partir de este momento, para la obtención del extracto libre de células se procedió de igual manera a la descrita en el apartado II.5.1.1.

II.5.2.2.- Precipitación con sulfato amónico

El extracto libre de células obtenido en el paso anterior, se precipitó con sulfato amónico a distintos porcentajes de saturación, entre el 10% y el 95% (p/v). El sobrenadante del 70% resultó contener la mayor parte de la actividad arginasa. Para ello se procedió de forma idéntica a la descrita en el apartado II.5.1.2., con la salvedad que el pH del tampón de diálisis fue de 6,5.

II.5.2.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico

El sobrenadante del sulfato amónico dializado, el cual contenía la mayor parte de la actividad arginasa, fue utilizado para la adsorción de la proteína sobre gel de fosfato cálcico. El procedimiento empleado fue idéntico al descrito en el apartado II.5.1.3. En esta ocasión la molaridad del tampón utilizada para desorber la proteína varió entre 0,02 M y 0,3 M.

II.5.2.4.- Electroenfoque en columna

La fracción de la cual se desorbió la mayor actividad arginasa fue electroenfocada de acuerdo a lo descrito en el apartado II.5.1.4., con la salvedad que el pH del tampón de diálisis fue de 6,5.

II.5.3.- Isoforma IV de arginasa

II.5.3.1.- Obtención del extracto libre de células

Muestras de 50 g de talo seco se incubaron en 1.250 ml de una disolución de L-arginina 40 mM, tamponada con Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, durante 8 h, a 26°C en oscuridad.

Al cabo de este tiempo se recogió el medio de incubación, se filtró a través de un filtro Whatman nº 3 y se concentró a 300 ml. En este extracto se valoró la cantidad de proteínas y la actividad arginasa, según lo descrito en los apartados II.3 y II.4, respectivamente.

II.5.3.2.- Precipitación con sulfato amónico

El filtrado obtenido fue precipitado con sulfato amónico a distintos porcentajes de saturación, entre el 10% y el 95% (p/v). El sobrenadante del 50% resultó contener la mayor parte de la actividad arginasa. El procedimiento empleado fue el mismo que se describió en el apartado II.5.1.2.

II.5.3.3.- Adsorción sobre gel de fosfato cálcico

La fracción que contenía la actividad arginasa mayoritaria (sobrenadante) fue adsorbida sobre gel de fosfato cálcico de acuerdo a lo descrito en el apartado II.5.1.3. La molaridad del tampón empleado en la desorción varió entre 0,02 M y 0,3 M.

II.5.3.4.- Electroenfoque en columna

El sobrenadante de mayor actividad arginasa, obtenido tras la desorción, fue electroenfocado según lo descrito en el apartado II.5.1.4.

II.6.- DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

II.6.1.- Mediante electroenfoque en columna

El punto isoelectrico de cada una de las isoformas (I, II, III y IV) de arginasa se determinó mediante un electroenfoque en columna, idéntico al descrito en el apartado II.5.1.4.

II.6.2.- Mediante electroforesis capilar

El punto isoelectrico de las cuatro isoformas de arginasa, obtenido mediante electroenfoque en columna, fue corroborado en electroforesis capilar.

El equipo utilizado fue un Spectraphoresis 500 de Spectra Physics, equipado con un integrador SP 4290 (Spectra Physics), bajo las siguientes condiciones de análisis:

- i) Características del capilar: Tubo de sílice fundida, recubierto de poliimida.
 - diámetro interno: 75 μm
 - diámetro externo: 190 μm
- ii) Longitud del capilar hasta la ventana de detección: 60 cm
- iii) Electrolito: tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0 ó bien tampón borato sódico 15 mM, llevado a pH 7,1 con ácido fosfórico 14,7 M.
- iv) Temperatura: 30°C.
- v) Voltaje aplicado: 17 kV ó 25 kV.
- vi) Detección: UV-"on column" a 200 nm.
- vii) Tipo de inyección: Hidrodinámica durante 9 s.
- viii) Volumen de inyección: 36 nl.

Las muestras fueron dializadas frente a agua-HPLC (tridestilada y filtrada a través de filtros Millipore GS de 0,22 μm de diámetro de poro), llevadas a sequedad en corriente de nitrógeno y resuspendidas nuevamente en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,0 ó 7,1, según se

indique.

La determinación del punto isoeléctrico se llevó a cabo interpolando el valor obtenido de movilidad electroforética (μ_e) en una recta de calibrado construida con proteínas de punto isoeléctrico conocido. Las proteínas utilizadas fueron: Mioglobina de caballo (pI 7,0), aldolasa de conejo (pI 6,6), anhidrasa carbónica de eritrocito de vaca (pI 5,9), alcohol deshidrogenasa de levadura (pI 5,4) y tiroglobulina de vaca (pI 4,6) (todas ellas de Sigma Chem.Co.) y benzol (Carlo Erba) como marcador neutro.

La movilidad electroforética viene definida como:

$$\mu_e = \frac{L^2}{t_m \cdot V} \text{ en cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}, \text{ donde:}$$

L = longitud del capilar (cm)

t_m = tiempo de migración (s)

V = voltaje aplicado (V)

II.7.- ANALISIS DE AMINOACIDOS

Alicuotas (1 ml) de cada una de las cuatro isoformas de arginasa purificadas, se dializaron frente a agua-HPLC durante 24 h con objeto de eliminar las sales procedentes del tampón en el cual se hallaban disueltas. A continuación se liofilizaron y, después, se disolvieron en 0,2 ml de HCl 6 N conteniendo fenol al 0,1% (p/v) y 20 nmol·ml⁻¹ de *nor*-leucina como patrón interno. La hidrólisis se llevó a cabo a 105°C durante 24 h en ampollas herméticas (Gavilanes et al., 1982). Los hidrolizados se llevaron a sequedad, sometiéndolos después a dos lavados con 200 µl de agua destilada, seguidos del correspondiente secado. Las muestras así obtenidas, fueron procesadas en un analizador de aminoácidos Beckman System 6300 con un módulo de interfase analógica (System Gold). La duración del análisis fue de 100 min. Los residuos de Cys fueron determinados como contenido en ácido cistéico. Para ello, antes de la hidrólisis, fue necesario oxidar la proteína con ácido per fórmico (Hirs, 1967).

Para preparar el ácido per fórmico se tomaron cantidades de agua oxigenada de 30

volúmenes y ácido fórmico al 99% (v/v) en proporción 1:9, manteniéndose esta mezcla a 25°C durante 2,5 h. Transcurrido este tiempo se mantuvo a -10°C durante 15 min como mínimo.

La oxidación de la proteína se llevó a cabo disolviéndola en ácido fórmico al 99%, a una concentración de 10-30 mg·ml⁻¹. Para una cantidad de proteína inferior a 0,1 mg, se utilizaban 12,5 µl de ácido fórmico. La disolución se mantenía en un baño de hielo. Por cada mg de proteína se añadía una alícuota de 100 µl de ácido per fórmico preparado, manteniéndola a -10°C durante 2,5 h.

Por último, se procedió a la eliminación del ácido por liofilización, para lo cual se diluía la muestra, al menos, 25-30 veces con agua destilada.

Posteriormente, la proteína se sometió a hidrólisis ácida durante 24 h, en las condiciones ya descritas.

El Trp fue determinado espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Beaven y Holiday (1952). Se preparó una disolución de proteína en NaOH 0,1 N, cuya absorción a 280 nm estuviera comprendida entre 0,2 N y 0,5 N. Se determinó la absorbancia de esta disolución a 294,4 y a 280 nm, calculándose el contenido en Trp a partir de la ecuación:

$$M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}} = \frac{0,592 \times \Delta_{294,4} - 0,263 \times \Delta_{280,0}}{0,263 \times \Delta_{280,0} - 0,170 \times \Delta_{294,4}}$$

donde M_{Tyr} y M_{Trp} son los moles de Tyr y Trp por mol de proteína, respectivamente. M_{Tyr} se calculó a partir del análisis de aminoácidos de la proteína.

II.8.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

El peso molecular de las diferentes isoformas se determinó mediante HPLC a partir de las enzimas purificadas obtenidas por electroenfoque en columna. Las isoformas nativas I, II, III y IV de arginasa fueron desnaturalizadas con dodecil sulfato sódico, SDS (Sigma Chem.Co.) al 1%

(p/v) en presencia de β -mercapto etanol (Fluka) al 2,5% (p/v). Las muestras se mantuvieron en agua hirviendo durante 5 min y después se filtraron por filtros de 0,45 μm de diámetro de poro (Alltech) antes de ser inyectadas en la columna cromatográfica. Mediante mecanismos de HPLC-exclusión molecular también se determinaron los pesos moleculares de las isoformas de arginasa tras el ligamiento a los diferentes efectores. El equipo empleado fue un cromatógrafo de líquidos Spectra Physics compuesto por una bomba de gradiente ternario SP 8800, un detector UV-Vis SP 8490 y un inyector Rheodyne 7125 acoplado a un integrador SP 4290 también de Spectra Physics. Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

a) Columna TSK gel G5000 PWXL (Supelco).

- i) Partícula: gel de vinilo-polimérico.
- ii) Diámetro de poro: 1000 Å.
- iii) Diámetro de partícula: 10 μm .
- iv) Configuración de la columna:
 - diámetro interno: 7,8 mm.
 - longitud: 300 mm.
- Presión: 7 bares.
- Fase móvil: Tampón Tris-HCl 75 mM, pH 9,1 ó 6,5.
- Flujo: 0,3 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
- Temperatura: Ambiente.
- Volumen de inyección: 10 μl .
- Detector: UV a 280 nm.

b) Columna Zorbax GF-450 (Du Pont).

- i) Partícula: sílice esférica.
- ii) Modificación de la superficie: Zirconio.
- iii) Fase estacionaria ligada: monocapa hidrofílica de
tipo diol.
- iv) Diámetro de poro: 300 Å.
- v) Diámetro de partícula: 6 μm .
- vi) Configuración de la columna:

- diámetro interno: 9,4 mm.
- longitud: 250 mm.

Conectada en serie con la:

Columna: Zorbax GF-250 (Du Pont).

- i) Partícula: sílice esférica.
 - ii) Modificación de la superficie: Zirconio.
 - iii) Fase estacionaria ligada: monocapa hidrofílica de tipo diol.
 - iv) Diámetro de poro: 150 Å.
 - v) Diámetro de partícula: 4-4,5 µm.
 - vi) Configuración de la columna:
 - diámetro interno: 9,4 mm.
 - longitud: 250 mm.
- Presión: 65 bares.
 - Fase móvil: *Tampón Tris-HCl* 200 mM, pH 7,6 ó 9,1.
 - Flujo: 1 ml·min⁻¹
 - Temperatura: Ambiente.
 - Volumen de inyección: 10 µl.
 - Detector: UV a 280 nm.

La configuración a) se utilizó en el análisis paralelo de los distintos pasos del proceso de purificación y para determinar el peso molecular de la forma nativa de cada isoforma de arginasa. La configuración b) se utilizó para determinar el peso molecular de las formas nativa y desnaturalizada. También se empleó para calcular el peso molecular de los diferentes polímeros de arginasa tras el ligamiento del fenol correspondiente. En los análisis de proteínas desnaturalizadas, las columnas fueron equilibradas con fase móvil conteniendo SDS al 1% (p/v).

El peso molecular se determinó interpolando el volumen relativo de elución obtenido (V_e/V_0) en una recta de calibrado construida con proteínas de peso molecular conocido. Las proteínas utilizadas fueron: Tiroglobulina de vaca ($M_r=660$ kDa); Apoferritina de bazo de caballo ($M_r=440$ kDa); β -amilasa de batata ($M_r=200$ kDa); Albúmina de huevo ($M_r=67$ kDa); Anhidrasa

carbónica de eritrocito de vaca ($M_r=29$ kDa) y Citocromo c de corazón de vaca ($M_r=12,4$ kDa).

II.9.- CARACTERIZACION ESPECTROSCOPICA

II.9.1.- Espectros de absorción ultravioleta

La obtención del espectro ultravioleta de las distintas isoformas (I, III y IV) de arginasa se llevó a cabo en cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico (Starna Ltd.), empleándose un espectrofotómetro Varian, modelo DMS 90. La determinación se realizó con una disolución de proteína de 42, 37 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para las isoformas I, III y IV, respectivamente, en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, para las isoformas I y IV, y pH 6,5 para la isoforma III. Las muestras se filtraron a través de filtros de 0,45 μm de diámetro de poro. Para sustraer la absorción de tampón, se realizó una corrección de la línea base del espectro.

II.9.2.- Espectros de emisión de fluorescencia

Estas medidas se hicieron en un espectrofluorímetro Kontron, modelo SFM 25, equipado con un fotomultiplicador de referencia. El equipo poseía una lámpara de xenon, con una rendija de emisión y excitación de 10 y 15 nm, respectivamente. Las cubetas de cuarzo, de 5 caras pulimentadas, eran de 10 mm de paso óptico (Starna Ltd.). Los análisis se realizaron a temperatura ambiente y la concentración de proteína fue de 42, 37 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para las isoformas I, III y IV, respectivamente, en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, para las isoformas I y IV, y pH 6,5 para la isoforma III. Todas las muestras se filtraron a través de filtros de 0,45 μm de diámetro de poro, como paso previo a la realización de los espectros. Para sustraer la fluorescencia del tampón se realizó una corrección de línea base.

Los espectros se registraron empleando alternativamente como longitud de onda de excitación 257, 275 y 295 nm. Para realizar el espectro simultáneo de emisión y excitación se eligió un rango de longitudes de onda comprendido entre 410 y 285 nm para la emisión y entre 330 y 205 nm para la excitación.

II.10.- VALORACION DE FENOLES LIQUENICOS MEDIANTE HPLC

II.10.1.- Extracción de fenoles con diferentes mezclas de disolventes orgánicos

II.10.1.1.- A partir de talos

Muestras de 0,3 g de talo fueron incubadas en 7,5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, conteniendo L-arginina 40 mM o cicloheximida 40 μ M, a 26°C en oscuridad. A diferentes tiempos, las muestras fueron lavadas superficialmente durante 5 min con 15 ml de acetona a temperatura ambiente. La fase acetónica se filtró a través de papel Whatman nº 2, fue secada en corriente de aire y el residuo seco se almacenó a -13°C hasta su utilización.

Una vez eliminados los fenoles corticales, se procedió a extraer aquellos retenidos en el talo mediante tres pasos. En primer lugar, los talos fueron macerados con 15 ml de éter dietílico : acetato de etilo (65:35, v/v) durante 15 min. La fase orgánica se filtró a través de papel Whatman nº 2 y se guardó. El residuo sólido se maceró con otros 15 ml de cloroformo : acetonitrilo (60:40, v/v) durante 15 min. La fase orgánica fue filtrada como la anterior y guardada y el residuo sólido fue nuevamente macerado durante 15 min con cloroformo : acetonitrilo (60:40, v/v). La fase orgánica se filtró y guardó como las anteriores. Este último residuo sólido se descartó y las fases orgánicas mezcladas se llevaron a sequedad en el mismo tubo. El extracto orgánico seco se almacenó a -13°C hasta su utilización.

II.10.1.2.- A partir del medio de incubación

Los fenoles segregados al medio de incubación, procedentes de talos incubados en las condiciones descritas en el apartado anterior, fueron extraídos mediante reparto con diferentes mezclas de disolventes orgánicos de la manera que se describe a continuación.

A cada medio (entre 5 y 6 ml) , se añadieron 10 ml de éter dietílico : acetato de etilo

(65:35, v/v) y después se agitó fuertemente durante 30 s. La fase orgánica se recuperó y la fase acuosa del medio se utilizó para una segunda extracción con 10 ml de cloroformo : acetonitrilo (60:40, v/v). Después de otros 30 s de agitación fuerte, se recuperó la fase orgánica y los fenoles remanentes en el medio fueron nuevamente extraídos con 10 ml de cloroformo : acetonitrilo (60:40, v/v). Las tres fases orgánicas se recogieron en el mismo tubo y se llevaron a sequedad bajo corriente de aire. El residuo orgánico seco se almacenó a -13°C hasta su utilización.

II.10.1.3.- A partir del extracto libre de células

Para la valoración de los fenoles liquénicos presentes en los extractos libres de células procedentes de talos y medios de incubación, fragmentos de talo de 0,3 g de peso seco se hicieron flotar en los medios descritos en el apartado II.2 durante diferentes tiempos. El tiempo de incubación fue aquel donde existía la mayor actividad de cada isoforma de arginasa:

- i) 6 h para las isoformas I y II, recogiendo el talo.
- ii) 16 h para la isoforma III, recogiendo el talo.
- iii) 8 h para la isoforma IV, recogiendo el medio de incubación.

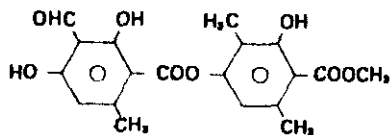
El extracto libre de células se obtuvo según lo descrito en los apartados II.5.1.1, II.5.2.1 y II.5.3.1, respectivamente, tras haber eliminado los fenoles corticales de acuerdo con el apartado II.10.1.1. Los fenoles presentes en los extractos fueron extraídos mediante reparto en fases orgánicas, según lo descrito en el apartado II.10.1.2. Una vez eliminados los fenoles corticales, en el talo todavía se pueden localizar fenoles extracelulares. Estos fenoles se encuentran cristalizados sobre las paredes del micobionte y del fotobionte y pueden disolverse parcialmente en el proceso de obtención del extracto libre de células. Con objeto de valorar la contribución aproximada de los fenoles extracelulares a dicho extracto, se procedió a retirar los fenoles corticales (apartado II.10.1.1); macerando ligeramente los talos a continuación con 5 ml de éter etílico : acetato de etilo (65:35, v/v) durante 2 min. La fase orgánica se filtró a través de papel Whatman nº 2 y se guardó. El residuo sólido se lavó con 5 ml de cloroformo : acetonitrilo (60:40, v/v) durante 2 min y la fase orgánica fue filtrada como la anterior. Las dos fases fueron mezcladas y llevadas a sequedad en el mismo tubo. El residuo sólido se utilizó para obtener un extracto libre de células

según lo descrito en los apartados II.5.1.1, II.5.1.2.1 y II.5.3.1, respectivamente.

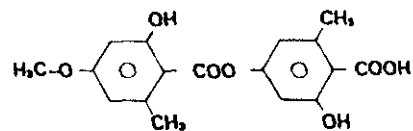
En la Figura 2 se puede observar el diagrama de flujo explicativo del proceso de extracción de los fenoles.

II.10.2.- Estabilidad de los fenoles en disoluciones acuosas

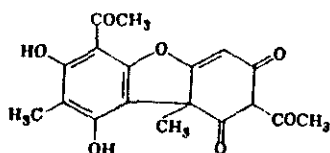
La estabilidad de los fenoles liquénicos en medios acuosos se estudió en disoluciones de fenoles patrón comerciales: atranorina, ácido evérnico (Sigma Chem.Co.) y ácido úsnico (Sarsintex) de concentración conocida; tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, o bien, pH 6,5. Las disoluciones se mantuvieron en agitación constante 120 h en oscuridad a 26°C. Durante este tiempo, se tomaron alícuotas cada 24 h y en ellas se valoró la concentración remanente de fenol, así como la de sus posibles productos de degradación, mediante HPLC.



Atranorina



Acido evérnico



Acido úsnico

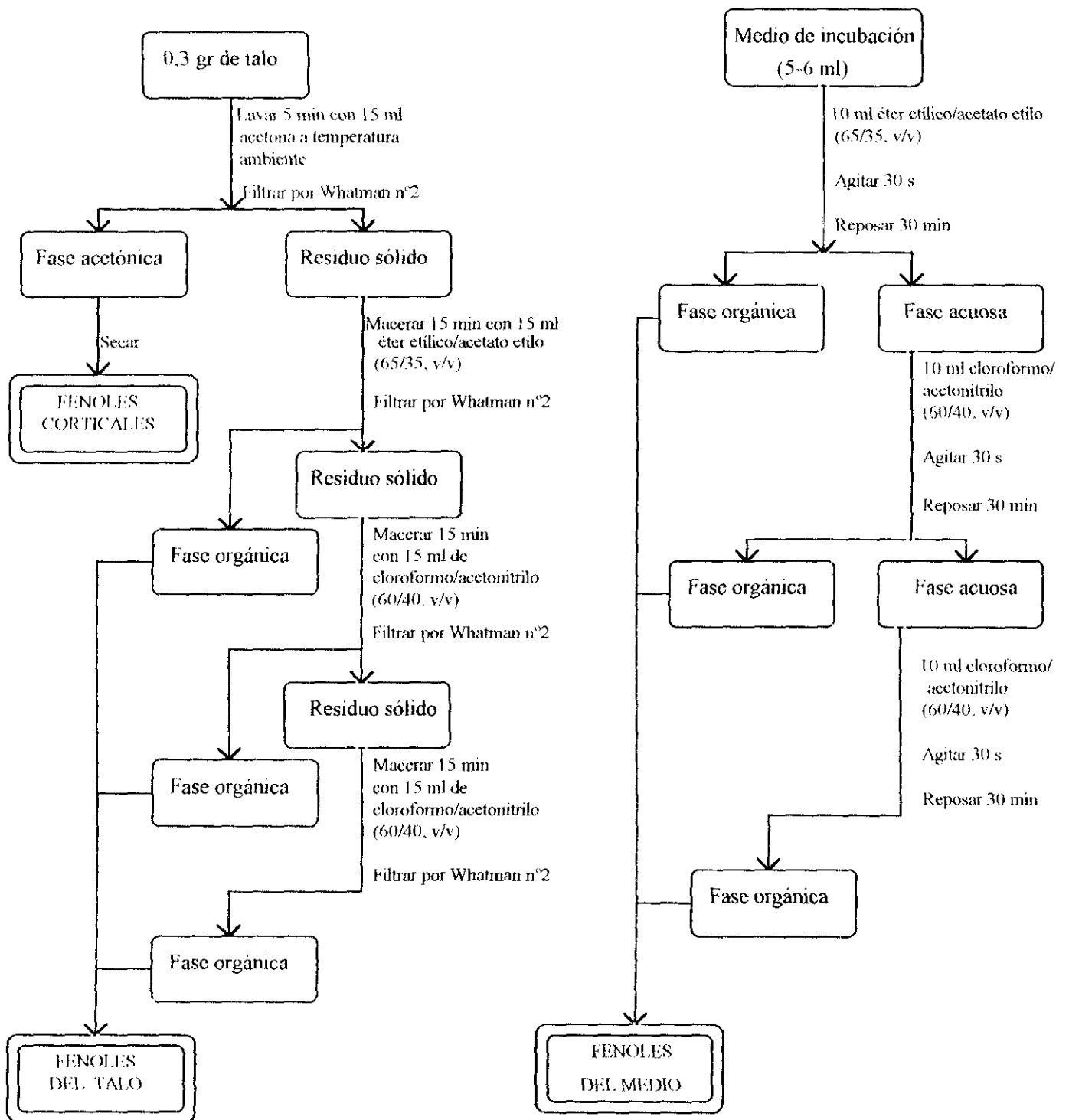


Fig. 2.- Diagrama de flujo de extracción de fenoles

II.10.3.- Espectro de absorción ultravioleta de fenoles liquénicos

La obtención del espectro ultravioleta de las distintas isoformas (I, III y IV) de arginasa se llevó a cabo en cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico (Starna Ltd.), empleándose un espectrofotómetro Varian DMS 90. La determinación se realizó empleando una concentración de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico, disuelta en una mezcla de agua : ácido acético (99:1, v/v)/acetonitrilo (70/30, v/v). Las muestras se filtraron a través de filtros de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro. Para sustraer la absorción de la fase móvil se realizó una corrección de la línea base del espectro.

II.10.4.- Valoración de fenoles liquénicos mediante HPLC

El análisis y cuantificación de sustancias liquénicas se llevó a cabo mediante HPLC, en un cromatógrafo de líquidos Varian 5060, equipado con un integrador Vista CDS 401 (Varian), bajo las siguientes condiciones de análisis:

- i) Columna: Fase reversa, Nucleosil 5C8 (Scharlau)
 - Diámetro de partícula: $5 \text{ }\mu\text{m}$.
 - Dimensiones: □ longitud: 125 mm.
□ diámetro interno: 4 mm.
- ii) Fase móvil: Agua-HPLC : ácido acético (99:1,v/v)
/acetonitrilo (30/70, v/v).
- iii) Flujo: $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
- iv) Temperatura: 26°C .
- v) Presión: 60 atm.
- vi) Detector: UV; - de 0 a 2,6 min a 270 nm.
- de 2,6 min a 10 min a 280 nm.
UAFE: 0,002.
- vii) Volumen de inyección: $10 \text{ }\mu\text{l}$.

viii) Como patrón externo se utilizó ácido o-ftálico a una concentración fija de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, o el fenol que se indique en cada caso (atranorina $0,02 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; ácido evérnico $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

La cuantificación de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico se llevó a cabo mediante la interpolación de la respuesta del detector, en cuentas de área, en una recta de calibrado construida con cada uno de los fenoles comerciales patrón indicados en el apartado II.10.2.

II.11.- CINETICA DE SATURACION EN AUSENCIA DE EFECTORES

El efecto de la concentración de sustrato (L-arginina) sobre las isoformas I (ya que las isoformas I y II demostraron ser prácticamente iguales), III y IV de arginasa se estimó en mezclas de reacción conteniendo enzima purificada y concentraciones crecientes de L-arginina entre 1,0 y 9,0 mM, según la isoforma. Las mezclas de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenían: 10 μmoles de tampón Tris-HCl (pH 9,1, para las muestras incubadas en L-arginina 40 mM o bien pH 6,5 para las muestras que fueron incubadas en cicloheximida 40 μM); 7,5 μmoles de ácido maléico; 5,0 μmoles de sulfato de manganeso; 33,8 mg de ureasa cristalina; 20,0 μg de proteína líquénica y las siguientes concentraciones de sustrato:

- entre 0,5 y 3,5 μmol (isoforma I)
- entre 0,5 y 4,5 μmol (isoforma III)
- entre 0,5 y 4,5 μmol (isoforma IV)

Las mezclas se incubaron a 30°C y la reacción fue detenida, tras 25 min, mediante la adición de K_2CO_3 a saturación. Después se dejaron transcurrir 2 h para completar la difusión del amonio formado y posterior fijación sobre H_2SO_4 0,02 N, según el método de microdifusión de Conway (1962).

Como control se prepararon mezclas de reacción en las cuales el sustrato era sustituido por igual volumen de tampón al pH correspondiente en cada caso. La valoración cuantitativa del amonio resultante se estimó de idéntica manera a lo descrito en el apartado II.3.

II.12.- CINETICA DE SATURACION EN PRESENCIA DE EFECTORES: ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO.

Para estudiar el efecto de la concentración de L-arginina sobre las isoformas I, III y IV de arginasa en presencia de los distintos efectores (a concentración fija) se incubaron mezclas de reacción que contenían enzima purificado, efector y concentraciones variables de sustrato. Las mezclas de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenían: 5 μ moles de tampón Tris-HCl (pH 9,1 para las muestras incubadas en L-arginina 40 mM o bien pH 6,5 para las muestras incubadas en cicloheximida 40 μ M); 7,5 μ moles de ácido maléico; 5,0 μ moles de sulfato de manganeso; 33,8 mg de ureasa cristalina; 20,0 μ g de proteína líquénica y la concentración de efector que se especifica en la Tabla I:

TABLA I

| ISOFORMA DE ARGINASA | EFECTOR | | |
|----------------------|------------|----------------|--------------|
| | ATRANORINA | ACIDO EVERNICO | ACIDO USNICO |
| I | 0,10* | 0,39 | 0,52 |
| III | 0,57 | 1,17 | 1,41 |
| IV | 5,06 | 3,46 | 3,82 |

* nmol de efector en la mezcla de reacción

Como control se utilizaron las mismas mezclas de reacción en las cuales el efector era sustituido por 60 μ moles de tampón Tris-HCl, pH 9,1, para las isoformas I y IV ó bien pH 6,5 para la isoforma III.

Tras 20 min de preincubación enzima-efector a 30°C, se añadió el sustrato (L-arginina) en el rango de concentraciones especificada en el punto II.11. de este mismo apartado. Las mezclas se mantuvieron otros 25 min a 30°C y tras este tiempo se detuvo la reacción añadiendo K₂CO₃ saturado. La valoración cuantitativa del amonio resultante de la reacción se efectuó según lo descrito en el apartado II.3.

II.13.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) Y LA VELOCIDAD MAXIMA (v_{max}) DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA

Para el cálculo de K_m y v_{max} se eligieron las siguientes representaciones gráficas:

TABLA II

| REPRESENTACION GRAFICA | ORDENADAS (y) | ABSCISAS (x) |
|--------------------------|---------------|--------------|
| Michaelis-Menten | v_0 | $[s_0]$ |
| Hanes | $[s_0]/v_0$ | $[s_0]$ |
| Eisenthal-Cornish-Bowden | v_{max} | K_m |

justificando, en cada caso, el empleo de una u otra.

La representación de Hill ($\log(\frac{v_0}{v_{max} - v_0})$ frente a $\log [s_0]$) se eligió, como primera aproximación, para explicar la existencia de cooperatividad de las diferentes isoformas de arginasa.

A partir de estas mismas representaciones gráficas se calcularon $K_m(ap)$ (K_m aparente, en presencia del efector) y $v_{max}(ap)$ (v_{max} aparente en presencia del efector).

II.14.- ESTUDIOS DE LIGAMIENTO

Con objeto de estimar la afinidad entre los distintos efectores (atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico) y la proteína (isoformas I, III y IV de arginasa) se realizaron estudios de ligamiento mediante el procedimiento clásico del equilibrio de diálisis.

II.14.1.- Preparación de la membrana de diálisis

La membrana, de celulosa regenerada, suplementada en glicerol (Tubo Visking 27/32, Serva), se cortó en trozos de 6,0 cm de diámetro y se calentó a 70°C en agua destilada durante 1 hora. El proceso se repitió. Después se transfirió nuevamente a agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 h. Por último la membrana se dejó en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 (para isoformas I y IV) o pH 6,5 (para la isoforma III) hasta su utilización (entre 20 y 24 h).

II.14.2.- Células de diálisis

Las células de diálisis, dos submitades (A y B) de metacrilato, se fabricaron artesanalmente; admitiendo cada mitad exactamente 1,0 ml de volumen (Fig. 3). Ambas mitades quedaron separadas por la membrana semipermeable y permanecieron herméticas, con objeto de evitar alteraciones de volumen, una vez rellenas con la proteína y el ligando.

II.14.3.- Determinación del tiempo de equilibrio

Para determinar el tiempo de equilibrio se rellenaron las dos submitades (A y B) de las células de diálisis con una disolución de concentración fija de proteína en A:

- 2,55 μ M de isoforma I
- 1,42 μ M de isoforma III
- 1,50 μ M de isoforma IV

y la misma concentración de ligando (atranorina, ácido evérnico o ácido úsnico) en B. Se prepararon 20 cámaras de la misma manera y éstas se pusieron en agitación lenta a temperatura ambiente, recogiendo el ligando libre en equilibrio en las dos subcámaras tras 1-20 h en las condiciones descritas. El tiempo de equilibrio se definió como aquel después del cual la concentración de ligando libre recuperado de ambas subcámaras era el mismo. Con objeto de descartar la auto-asociación del ligando (atranorina, ácido evérnico o ácido úsnico) se determinó el tiempo de equilibrio en ausencia de la proteína: en este caso la subcámara A se rellenó con

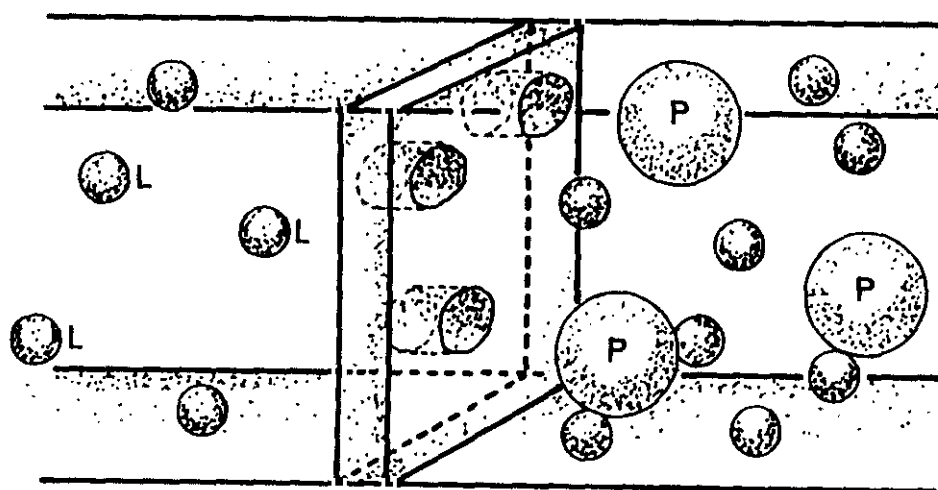


Figura 3.- Representación gráfica del principio del equilibrio de diálisis. En el medio se encuentra la membrana de diálisis que es permeable al ligando, L (atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico) pero no a la proteína, P (isoformas I, III y IV de arginasa).

tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 o pH 6,5. El tiempo de equilibrio obtenido en estas condiciones no difirió en más de una hora respecto al calculado en las otras condiciones.

La extracción del fenol se llevó a cabo según lo descrito en el apartado II.10.1.3., valorándolo cuantitativamente mediante HPLC (apartado II.9.3.).

II.14.4.- Cálculo del ligando unido

Para cada subcámara A (subcámara de la proteína) y B (subcámara del ligando) se realizaron los siguientes cálculos:

a) Subcámara de la proteína (A):

- P_t = moles totales de proteína (la indicada en el apartado II.14.3)

- $[L]$ = concentración de ligando libre en equilibrio

- $V_t[L]$ = moles totales de ligando libre en ambas subcámaras (el mismo en A y B)

- L_p = moles de ligando unido a la proteína

$$L_p = L_t - V_t[L]$$

- r = moles de ligando unido por mol de proteína

b) Subcámara del ligando (B):

- $[L]_i$ = concentración inicial del ligando en su compartimento (μM)

- L_t = moles totales de ligando en su compartimento

- $[L]$ = concentración de ligando libre en equilibrio

- V_t = volumen total de la subcámara (1 ml)

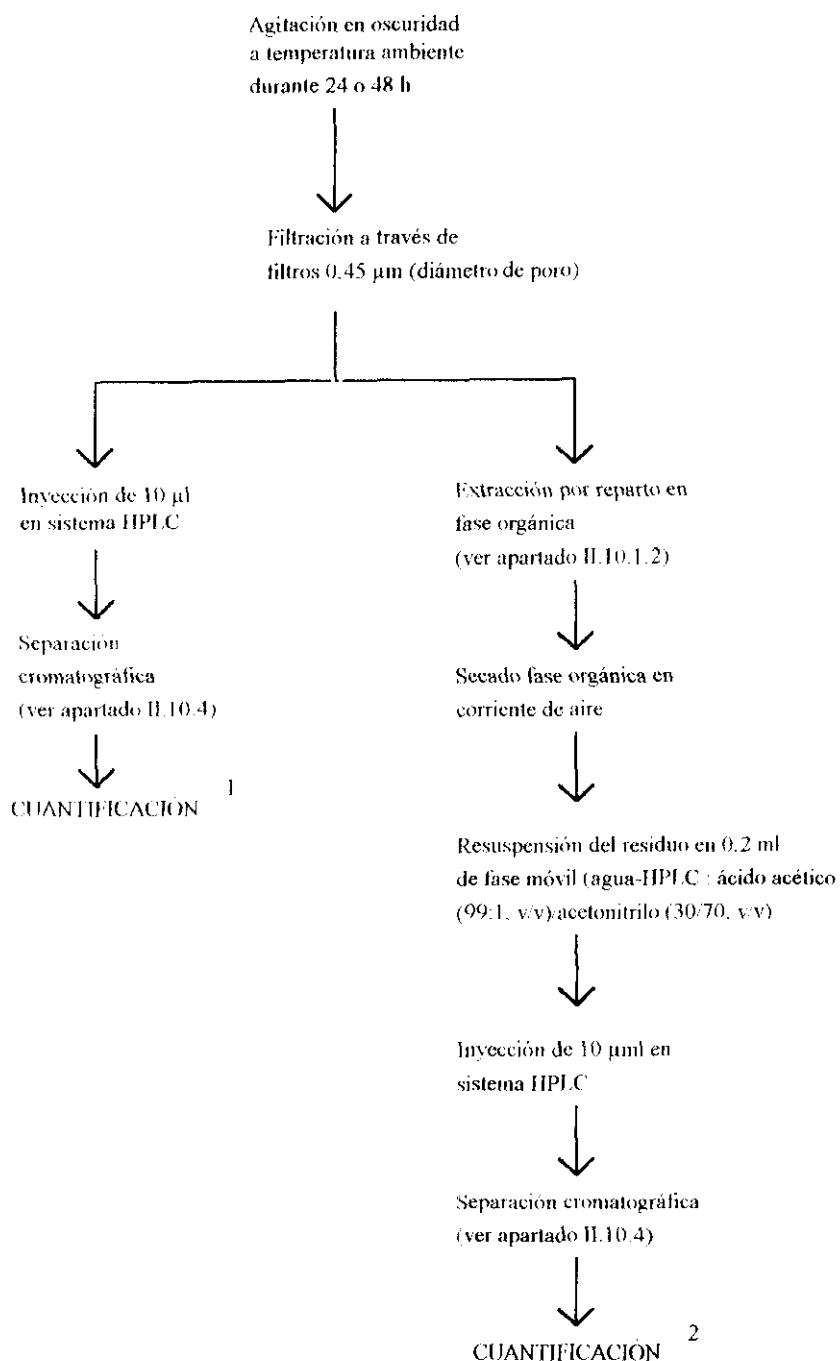
- $V_t[L]$ = moles totales de ligando libre en ambas subcámaras (el mismo en A y B)

La preparación de concentraciones crecientes de ligando total requiere especial atención ya que la solubilidad de los fenoles en disoluciones acuosas es muy baja y se puede correr el riesgo de precipitación no deseada durante el equilibrio de diálisis. En el diagrama de flujo

siguiente se explica el proceso seguido de forma detallada.

Preparación de concentraciones crecientes de ligando total:

Concentraciones crecientes de ligando en disoluciones tamponadas con Tris-HCl. (pH 9,1 para isoforma II e isoforma IV o pH 6,5 para isoforma III de arginasa)



¹ La cuantificación sin extracción previa da resultados aleatorios ya que la banda cromatográfica es de naturaleza distinta a la fase móvil empleada en el proceso de separación.

² Cuantificación correcta

La cuantificación del ligando total ha de ser un paso previo al equilibrio de diálisis y, en función del rendimiento obtenido en el proceso de preparación, calcular la concentración inicial de ligando que estará en contacto con la proteína durante el proceso de ligamiento.

Transcurrido el tiempo necesario para la obtención de concentraciones iguales de ligando libre (equilibrio) en las dos subcámaras (ver apartado II.14.3), el proceso se detuvo extrayendo el ligando libre de las subcámaras A y B y la proteína con ligando unido (en el caso que se indique) de la subcámara A.

La extracción del ligando libre se realizó mediante reparto en fase orgánica (apartado II.10.1.2) cuantificándolo por HPLC mediante interpolación del número de cuentas de área en la recta de calibrado correspondiente.

La disolución conteniendo proteína con ligando unido se llevó a sequedad en corriente de nitrógeno. El residuo seco se resuspendió en agua-HPLC (agua utilizada en la preparación de la fase móvil para cromatografía de exclusión molecular) y se inyectó en la columna cromatográfica (configuración (b) del apartado II.8 de Material y Métodos). El volumen de elución relativo de los diferentes picos obtenidos se interpoló en la recta de calibrado correspondiente a las columnas diol GF450-GF250 con objeto de calcular su peso molecular (M_r).

II.14.5.- Representaciones gráficas de los datos de ligamiento

La gráfica de saturación se obtuvo representando los moles totales de ligando unido (L_p) frente al ligando total (L_t), obteniéndose una hipérbola.

Con objeto de estimar la respuesta biológica de la proteína al ligando efector, se eligieron las siguientes representaciones gráficas (Tabla III), una vez alcanzada la correspondiente saturación isoforma de arginasa/fenol.

TABLA III

| REPRESENTACION GRAFICA | ORDENADAS (y) | ABSCISAS (x) |
|------------------------|---------------|--------------|
| Dobles-inversas | r^{-1} | $[L]^{-1}$ |
| Logarítmica | r | $\log [L]$ |
| Scatchard | $r/[L]$ | r |

El número de sitios de unión por molécula de proteína (n) se estimó como la inversa del punto de corte con el eje de ordenadas en la representación de dobles inversas (Klotz y Hunston, 1971)

II.14.6.- Análisis estadísticos y proceso de datos

Con el conjunto de los valores obtenidos (n=3) para los diferentes ensayos, se calculó la media aritmética (valor representado o dato numérico) y la desviación típica (indicada mediante una barra para cada valor en las representaciones gráficas o por números en las tablas). El coeficiente de variación media obtenida resultó ser 8,6% (oscilando entre valores del 1% y 20%).

Se procedió a estudiar la significación de los datos (nivel de significación del 95%) mediante análisis de varianza o test de Newman-Keuls (paquete estadístico Kiwikstat 1.0, para ordenadores IBM AT).

El ajuste de rectas fue realizado por el método de mínimos cuadrados. Se aplicó el test de Student para comprobar que las pendientes eran significativamente diferentes.

III.- RESULTADOS

III.1.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE ARGINASA

En este bloque se presentan las Figuras 4 a 24 y las
Tablas IV a X

Se detallarán en primer lugar las características particulares de cada isoforma y después se analizarán las cualidades espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de todas ellas en conjunto.

III.1.1.- Purificación y caracterización de las isoformas I y II de arginasa

Las isoformas I y II de arginasa han sido purificadas a partir de extractos libres de células procedentes de talo de *E. prunastri* tras su incubación en disoluciones tamponadas de L-arginina 40 mM durante 6 h en oscuridad (apartado II.5.1.). En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos.

El extracto libre de células, concentrado a 150 ml de volumen, se precipitó con sulfato amónico a distintos porcentajes de saturación; el sobrenadante correspondiente al 85% (p/v) resultó contener la mayor actividad arginasa. Dicho sobrenadante se adsorbió sobre gel de fosfato cálcico, eluyendo del mismo las isoformas I y II con tampón Tris-HCl, pH 9,1, de molaridades 0,1 M y 2,0 M, respectivamente. Cada una de estas fracciones se concentró y fue electroenfocada, como último paso en el proceso de purificación. Las isoformas I y II de arginasa fueron purificadas 148 y 359 veces, con rendimientos del 4,5% y 1,8%, respectivamente. Las fracciones obtenidas del electroenfoque en columna se emplearon como fuente de proteína pura para los estudios de caracterización cinética posterior.

El proceso de purificación se analizó de forma paralela en HPLC-exclusión molecular en una columna TSK G-5000 PWXL. La Figura 4 A-D muestra los resultados obtenidos. El cromatograma correspondiente al extracto libre de células muestra 4 picos mayoritarios, los cuales no se corresponden con proteína pura por la mera observación de su asimetría. El pico que eluye a 31,54 min representa la arginasa contaminada con otras proteínas. En la Figura 4 C y 4 D se representan los cromatogramas procedentes de las arginasas I y II obtenidas tras desorción con Tris-HCl 0,1 M y 2,0 M, pH 9,1, respectivamente, del gel de fosfato cálcico. En C, los 3 picos que eluyen tras 32 min corresponden al tampón, el cual presenta una fuerte absorción a 280 nm debido a su grupo amino ($pK_{Tris} = 8,1$). Tras diálisis frente a agua-HPLC durante 2 h, no se

observan estos picos; fenómeno que viene representado en la Figura 4 D. Los picos mayoritarios en las Figuras 4 C y 4 D representan el 99,9% y 99,0%, respectivamente, de proteína inyectada.

III.1.1.1.- Determinación del punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) de las isoformas I y II de arginasa fue determinado mediante electroenfoque en columna y corroborado por electroforesis capilar.

En la Figura 5 se representa el electroenfoque correspondiente a la isoforma I. De las dos fracciones, cuya concentración de proteína fue superior a $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sólo aquella eluida a pH 5,86 presentaba actividad arginasa (112,9 unidades). El pI de la isoforma I de arginasa es de 5,86.

El punto isoeléctrico de la isoforma II de arginasa es de 5,8, ya que a este pH eluye el único pico con actividad arginasa (275,4 unidades) (Fig. 6).

La estimación del punto isoeléctrico mediante electroforesis capilar (EC) presenta la ventaja, sobre el electroenfoque en columna convencional, de una muy superior eficacia (5.500 platos teóricos para el pico de la isoforma I de arginasa en EC frente a 15,0 platos teóricos en electroenfoque en columna para el mismo pico). Por otro lado, al ser los picos tan eficaces es posible separar proteínas de pI muy similar con una gran resolución. Sin embargo, la EC tiene la desventaja de, al ser una técnica de microanálisis, admitir pequeños volúmenes y bajas concentraciones de muestra (volúmenes de inyección = 36 nl) a inyectar en el capilar. El problema se soslaya en parte empleando capilares de sílice de mayor diámetro interno, pero en éstos, la disipación del calor producido por el efecto Joule es más difícil, requiriendo el aparato un mejor sistema de refrigeración. En la Figura 7 A y B se representan los esquemas de capilares de sílice fundido recubierto de poliimida con distinto diámetro interno, 75 y 50 μm empleados en la valoración del pI de las isoformas de arginasa. A la vista de los electroforegramas de ambos capilares, se eligió el capilar de sílice de 75 μm de diámetro interno con un recubrimiento externo de 60 μm de poliimida y una longitud de 60 cm (Fig. 7A). La vida media de utilización del capilar es función de muchas variables: fuerza iónica del tampón empleado como electrolito, temperatura y voltaje aplicados, naturaleza de la muestra, etc. Por ello, es conveniente evaluar el estado del

capilar tras varios análisis con objeto de comprobar si sus características estructurales son las iniciales. Al microscopio óptico se pueden observar las posibles alteraciones. En la Figura 8 se representan algunas de ellas, donde la situación más grave (Fig. 8 f) es la ruptura del tubo interno que ocasiona una interrupción automática de flujo, hecho que ocurre con más frecuencia en capilares de 50 μm (Fig. 7 B). La vida media de uso se estimó en aproximadamente 100 inyecciones en los capilares de 75 μm donde el diámetro total, contabilizado el recubrimiento externo es de 190 μm .

En la Figura 9 A se representa el electroforegrama correspondiente a la isoforma I de arginasa obtenido a 30°C y 25 kV de voltaje aplicado, empleando como electrolito tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico; pH 7,1. La arginasa I eluye en estas condiciones a 6,85 min con carga negativa. Cuando el electrolito empleado es tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0, a 30°C y 17 kV de voltaje aplicado, la isoforma I eluye a 11,16 min, con carga negativa también (Fig. 9 B).

El tiempo de retención se transformó en movilidad electroforética (μ_e) según lo descrito en el apartado II.6.2 de Material y Métodos. La interpolación de μ_e en la correspondiente recta de calibrado (Fig. 10 A a pH 7,1 y Fig. 10 B a pH 9,0) construida con proteínas de punto isoelectrico conocido dio valores de $pI = 5,3$ y $pI = 4,5$, respectivamente. El valor medio, $pI = 4,9$, se eligió como punto isoelectrico determinado en electroforesis capilar.

La concentración de isoforma de arginasa II no fue suficiente como para deducir su pI en EC ya que, como se ha comentado anteriormente, el volumen de inyección que admite el capilar es muy pequeño y la concentración de proteína en ese volumen no era suficiente para detectar pico significativo de altura superior a la relación señal/ruido del detector. No obstante, los mejores electroforegramas obtenidos indicarían un pI alrededor de 5,0.

III.1.1.2.- Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las isoformas I y II de arginasa se estimó a partir de las fracciones del electroenfoque en columna, mediante el análisis de los productos obtenidos por

hidrólisis ácida a 24 h. Los resultados se recogen en la Tabla V. Las dos isoformas poseen una composición semejante, ya que el porcentaje de moles de la mayoría de los aminoácidos es similar. Las mayores diferencias se encuentran en Ser, Glx, Gly, Leu y Tyr. El porcentaje de moles más elevado corresponde a los restos ácidos, Asx y Glx, que representan el 11,4 y el 16,6%, respectivamente, en la isoforma de arginasa I y el 10,4 y 11,7%, respectivamente, en la isoforma II.

Otro aspecto a destacar de la composición de aminoácidos es la elevada proporción de residuos con grupos polares, Ser y Gly, los cuales representan el 10,4% y 15,6%, respectivamente, en la isoforma I y el 6,5% y 11,7%, respectivamente, en la isoforma II. La Cys representa el 1,3% y 1,9%, respectivamente, en las isoformas I y II. El número de residuos de Trp por cadena polipeptídica es de 1 en la isoforma I y de 3 en la isoforma II.

III.1.1.3.- Determinación del peso molecular

El peso molecular de las isoformas I y II de arginasa nativas fue estimado mediante exclusión molecular en HPLC utilizando dos tipos de columnas: a) una columna TSK G5000 PWXL y b) dos columnas en serie Zorbax-diol, según la configuración y condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. El peso molecular de las isoformas desnaturalizadas con SDS al 1% (p/v) fue calculado utilizando sólo la configuración b) equilibrando la columna con SDS al 1% (p/v). Las figuras 11 y 12 muestran los cromatogramas de proteínas patrón de peso molecular conocido separadas en las columnas TSK a) y Zorbax-diol b), respectivamente.

La columna TSK G5000 PWXL proporciona una mayor retención que las columnas Zorbax-diol GF450-GF250, ya que la tiroglobulina ($M_r=660$ kDa) eluye a 22,5 min y el citocromo c ($M_r=12,4$ kDa) a 33,4 min (Fig. 11). Entre ambas proteínas, el tiempo de retención es de 11,0 min. Las mismas proteínas, tiroglobulina y citocromo c, eluyen a 14,3 min y 23,3 min, respectivamente, en las columnas Zorbax-diol, lo cual indica que el tiempo de retención entre ambas es de 9,0 min (Fig. 12). Sin embargo, la eficacia de los picos es mayor en las columnas con

fase estacionaria de tipo diol, según se deduce del número de platos teóricos calculado para cada columna (Tabla VI).

Las fracciones del electroenfoque correspondientes a las isoformas I y II de arginasa (Tabla IV y Figs. 5 y 6), fueron dializadas en agua-HPLC durante 2 h y después concentradas. Las formas de arginasa nativa y la desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) se inyectaron en las columnas correspondientes, según lo descrito anteriormente. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos en las columnas Zorbax-diol GF450-GF250. El pico mayoritario de SDS al 1% (p/v) eluye a 14,4 min, ya que forma una especie de "agregado micelar" de elevado peso molecular en la fase móvil (Fig. 13 A). La isoforma I de arginasa eluye tanto nativa (Fig. 13 B) como desnaturalizada (Fig. 13 C) a 21,9 min; los tres picos que eluyen antes que la proteína corresponden a los distintos grados de agregación de la micela de SDS. El tiempo de retención de la isoforma II de arginasa, tanto nativa como desnaturalizada, fue de 22,2 min.

La interpolación de los valores del volumen de retención relativo de la isoforma I de arginasa nativa (1,89) y de la isoforma II de arginasa nativa (1,91), obtenidos en la columna TSK y los obtenidos en las columnas Zorbax-diol (1,77 y 1,79, respectivamente), en las rectas de calibrado correspondientes (Figs. 14 A y B, respectivamente), permitió estimar el peso molecular de las isoformas I y II de arginasa en 18,0 kDa y 16,0 kDa, respectivamente. Los volúmenes de retención relativos de las isoformas I y II desnaturalizadas con SDS, obtenidas en las columnas Zorbax-diol, fueron los mismos que los de las formas nativas. Las isoformas I y II de arginasa están compuestas de una sola subunidad, según se deduce de su tratamiento con SDS.

III.1.2.- Purificación y caracterización de la isoforma III de arginasa

La isoforma III de arginasa fue purificada a partir de extractos libres de células procedentes de talos de *E. prunastri* tras su incubación en disoluciones tamponadas de cicloheximida 40 μ M durante 16 h en oscuridad (apartado II.5.2.). En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos.

El extracto libre de células se concentró a 150 ml y se sometió a fraccionamiento con diferentes porcentajes (p/v) de sulfato amónico. La mayor actividad arginasa se obtuvo en el sobrenadante correspondiente al 70% (p/v) de saturación de la sal. Dicho sobrenadante se adsorbió sobre gel de fosfato cálcico, eluyendo del mismo la mayor actividad arginasa con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5. Esta fracción se concentró y fue electroenfocada en columna, como último paso en el proceso de purificación. Del electroenfoque se obtuvieron dos fracciones con actividad arginasa; una de ellas con actividad específica de 66,1 unidades y la otra con 11,2 unidades. A partir de este momento, se eligió la fracción de mayor actividad arginasa, a la cual se denominó isoforma III, para análisis posteriores. La isoforma III de arginasa se ha purificado 259 veces con un rendimiento del 2%.

Los distintos pasos del proceso de purificación fueron analizados paralelamente mediante HPLC en una columna de exclusión molecular TSK G5000 PWXL. La Figura 15 A-C muestra los resultados obtenidos. Los cromatogramas correspondientes al extracto libre de células (Fig. 15 A) y al sobrenadante de sulfato amónico al 70% (p/v) (Fig. 15 B) muestran diferentes picos correspondientes a distintas proteínas. En la Figura 15 C se muestra un pico mayoritario, el cual representa el 95% aproximadamente, que eluye a 28,5 min y corresponde a la isoforma III de arginasa; el pico que eluye a 38 min corresponde al tampón contenido en la muestra.

III.1.2.1.- Determinación del punto isoelectrico

El punto isoelectrico (pI) de la isoforma III de arginasa fue determinado mediante electroenfoque en columna y corroborado por EC.

En la Figura 16 se representa el electroenfoque de la fracción de arginasa de 66,1 unidades de actividad obtenida tras desorción con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5 del gel de fosfato cálcico. Como puede observarse, se detectan tres fracciones cuya concentración de proteína oscila entre 25,0 y 60,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pero sólo dos de ellas presentan actividad arginasa (66,1 unidades la que eluye a pH 6,18 y 11,2 unidades la que eluye a pH 4,68). El valor de pH al que eluye la

fracción con mayor actividad arginasa fue estimado como pI de la isoforma III de arginasa ($pI \sim 6,18$).

En la Figura 17 A y B se representan los electroforegramas correspondientes a la isoforma III de arginasa utilizando capilares de 75 μm de diámetro interno (Fig. 7 A). Cuando el electrolito empleado es tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico, pH 7,1, la temperatura 30°C y el voltaje 25 kV, la arginasa eluye a 6,33 min (Fig. 17 A), lo que demuestra que está cargada negativamente. Si el electrolito empleado como fase móvil es tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0, a 30°C y aplicando 17 kV, el pico de arginasa eluye a 10,33 min (Fig. 17 B), lo cual vuelve a indicar que está cargada negativamente.

Los tiempos de retención, 6,33 min y 10,33 min se transformaron en μ_e , en función de las dimensiones del capilar (apartado II.6.2 de Material y Métodos). La interpolación de la movilidad electroforética en la correspondiente recta de calibrado a pH 7,1 (Fig. 18 A) y pH 9,0 (Fig. 18 B) permite deducir un valor medio de pI entre 5,0 (con electrolito a pH 7,1) y 5,7 (con electrolito a pH 9,0). El valor de pI de la isoforma III de arginasa, determinado mediante EC es de 5,35.

III.1.2.2.- Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la isoforma III de arginasa se estimó a partir de la fracción del electroenfoque en columna que contenía mayor actividad (66,1 unidades), mediante el análisis de los productos obtenidos por hidrólisis ácida a 24 h. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VIII. La enzima es rica en aminoácidos con grupos no polares, como son Ala (% moles = 8,7), Val (% moles = 6,6) y Leu (% moles = 7,2), aminoácidos, por otra parte, típicos de pre-proteína. La isoforma III de arginasa presenta menor proporción de residuos ácidos, Asx y Glx, que las isoformas I y II. El contenido en Ser (6,6%) y Gly (11,2%) también es elevado respecto a otros aminoácidos. La Cys representa el 2,7% del total. El número de residuos de Trp por cadena polipeptídica es de 9.

III.1.2.3.- Determinación del peso molecular

El peso molecular de la isoforma III de arginasa fue estimado mediante HPLC-exclusión molecular utilizando dos tipos de columnas: a) una columna TSK G5000 PWWL y b) dos columnas en serie Zorbax-diol GF450-GF250, según la configuración y condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. El peso molecular de la isoforma III desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) fue calculado utilizando sólo la configuración b), equilibrando la columna con SDS al 1% (p/v).

La fracción del electroenfoque (Tabla VII y Fig. 16) de mayor actividad arginasa, correspondiente a la isoforma III, fue dializada frente a agua-HPLC durante 2 h y después concentrada. La forma nativa y la enzima desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) se inyectaron en los dos sistemas de columnas descritos anteriormente. La interpolación del valor del volumen de retención relativo de la arginasa nativa (1,71), obtenido en la columna TSK y el obtenido en las columnas Zorbax-diol (1,70) en las rectas de calibrado correspondientes (Figuras 19 A y B, respectivamente), permitió estimar el peso molecular de la isoforma III de arginasa en, aproximadamente, 26,0 kDa. El peso molecular deducido de cada columna difiere en $\approx 1,0$ kDa. El volumen de retención relativo de la isoforma III desnaturalizada con SDS, obtenido en las columnas Zorbax-diol, fue el mismo que el de la forma nativa (1,68). La isoforma III de arginasa está compuesta de una sola subunidad, según se deduce de su tratamiento con SDS.

III.1.3.- Purificación y caracterización de la isoforma IV de arginasa

La isoforma IV de arginasa fue purificada a partir de extractos libres de células procedentes de los medios de incubación de talos sumergidos en disoluciones tamponadas de L-arginina 40 mM durante 8 h en oscuridad (apartado II.5.3. de Material y Métodos). En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos.

El extracto libre de células se concentró a 310 ml y se sometió a fraccionamiento con sulfato amónico de diferente porcentaje de saturación, entre el 10% y el 95% (p/v). La mayor

actividad arginasa se observó en el sobrenadante correspondiente al 50% (p/v) de saturación de la sal. Dicho sobrenadante se adsorbió sobre gel de fosfato cálcico, eluyendo del mismo la mayor actividad arginasa con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1. Esta fracción se concentró y fue electroenfocada en columna, como último paso en el proceso de purificación. Del electroenfoque en columna se obtuvieron tres fracciones con actividad arginasa: una de 26,2 unidades, otra de 9,6 unidades y otra de 123,2 unidades. A partir de este punto, se eligió la fracción de mayor actividad específica (123,2 unidades), a la cual se denominó isoforma IV de arginasa, para posteriores análisis. Dicha arginasa ha sido purificada 616 veces con un rendimiento del 5,6%, aproximadamente.

Los distintos pasos del proceso de purificación fueron analizados paralelamente mediante HPLC en una columna de exclusión molecular TSK G5000 PWXL. La Figura 20 A-D muestra los resultados obtenidos. Los cromatogramas correspondientes al extracto libre de células (Fig. 20 A) y al sobrenadante del 50% (p/v) de saturación de sulfato amónico (Fig. 20 B) muestran un mayor número de picos que en las Figuras 4 A-B y 15 A-B, correspondientes a las isoformas I y III de arginasa, lo cual indicaría una gran secreción de proteínas al medio de incubación. En la Figura 15 C se muestra el cromatograma correspondiente a la fracción de arginasa desorbida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1, del gel de fosfato cálcico. En este caso, a diferencia de las anteriores purificaciones, la pureza de esta fracción no es tan grande, ya que se pueden apreciar claramente tres picos de tiempos de retención a 26,8, 29,55 y 29,85 min, respectivamente, con actividad arginasa. Tras el electroenfoque, logra obtenerse la proteína pura, como demuestra el cromatograma de la Figura 20 D, donde el pico en solitario que eluye a 29,85 min representa el 99,9% frente al 32% del pico que eluye al mismo tiempo en la Fig. 20 C.

III.1.3.1.- Determinación del punto isoelectrico

El punto isoelectrico (pI) de la isoforma IV de arginasa fue determinado mediante electroenfoque en columna y corroborado por EC.

En la Figura 21 se representa el electroenfoque de la fracción de arginasa de 68,9 unidades de actividad (Tabla IX) obtenido tras desorción con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1, del gel de fosfato cálcico. Como puede observarse, se obtienen tres fracciones de 26,2, 9,6 y 123,2 unidades de actividad, cuya concentración de proteína oscila entre 25 y 65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Estas tres fracciones eluyen a pH 8,3, 7,9 y 5,6, respectivamente. La fracción correspondiente a pH 5,6, valor que se asimiló al pI, que presentaba la mayor actividad arginasa, fue denominada isoforma IV, empleándose para los análisis posteriores.

En las Figuras 22 A y B se representan los electrofórogramas correspondientes a la isoforma IV de arginasa utilizando capilares de 75 μm de diámetro interno (Fig. 7 A). Cuando el electrolito empleado como fase móvil es tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico, pH 7,1, a 30°C y aplicando 25 kV de voltaje, la isoforma IV de arginasa eluye a 7,6 min (Fig. 22 A), lo que demuestra que está cargada negativamente. Si el electrolito utilizado es tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0, a 30°C y con un voltaje de 17 kV, el pico de arginasa aparece a 10,5 min (Fig. 22 B), lo que corrobora su carga negativa.

Los tiempos de retención, 7,6 min y 10,5 min, se transformaron en μ_e (apartado II.6.2 de Material y Métodos). La interpolación de la movilidad electroforética en la recta de calibrado a pH 7,1 (Fig. 23 A) y a pH 9,0 (Fig. 23 B) permite determinar un valor de pI, en ambos casos, de 4,8 para la isoforma IV de arginasa.

III.1.3.2.- Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la isoforma IV de arginasa se calculó a partir de la fracción del electroenfoque en columna que poseía la mayor actividad (123,2 unidades), mediante el análisis de los productos obtenidos por hidrólisis ácida a 24 h. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla X. La isoforma IV de arginasa es rica en aminoácidos ácidos, Glx y Asx, los cuales representan el 14,9% y 11,6%, respectivamente, del contenido total. También presenta una alta proporción de Ser (9,8%) y Gly (15,4%). Un aspecto a destacar de la composición aminoacídica es la similitud que presenta con la isoforma I (Tabla V) ya que prácticamente no

existen diferencias. La Cys representa el 0,8% del total de aminoácidos. El número de residuos de Trp por cadena polipeptídica se estimó entre 1 y 2.

III.1.3.3.- Determinación del peso molecular

El peso molecular de la isoforma IV de arginasa nativa fue estimado mediante HPLC-exclusion molecular utilizando dos tipos de columnas: a) una columna TSK G5000 PWXL y b) dos columnas en serie Zorbax-diol GF450-GF250, según la configuración y condiciones análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. El peso molecular de la isoforma IV desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) fue calculado utilizando sólo la configuración b), equilibrando la columna con SDS al 1% (p/v). La fracción del electroenfoque (Tabla IX y Fig. 21) de mayor actividad arginasa, correspondiente a la isoforma IV, fue dializada en agua-HPLC durante 2 h y después concentrada. Las formas nativa y desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) de arginasa fueron inyectadas en las columnas correspondientes, según lo descrito anteriormente. La interpolación del valor del volumen de retención relativo de la arginasa nativa (1,79), obtenido en la columna TSK y el obtenido en las columnas Zorbax-diol (1,75), en las rectas de calibrado correspondientes (Figs. 24 A y B, respectivamente), permitió estimar el peso molecular de la isoforma IV de arginasa en aproximadamente 20 kDa. El volumen de retención relativo de la isoforma IV desnaturalizada con SDS, obtenido en las columnas Zorbax-diol fue el mismo que el de la forma nativa. La isoforma IV de arginasa está compuesta de una sola subunidad, según se deduce de su tratamiento con SDS.

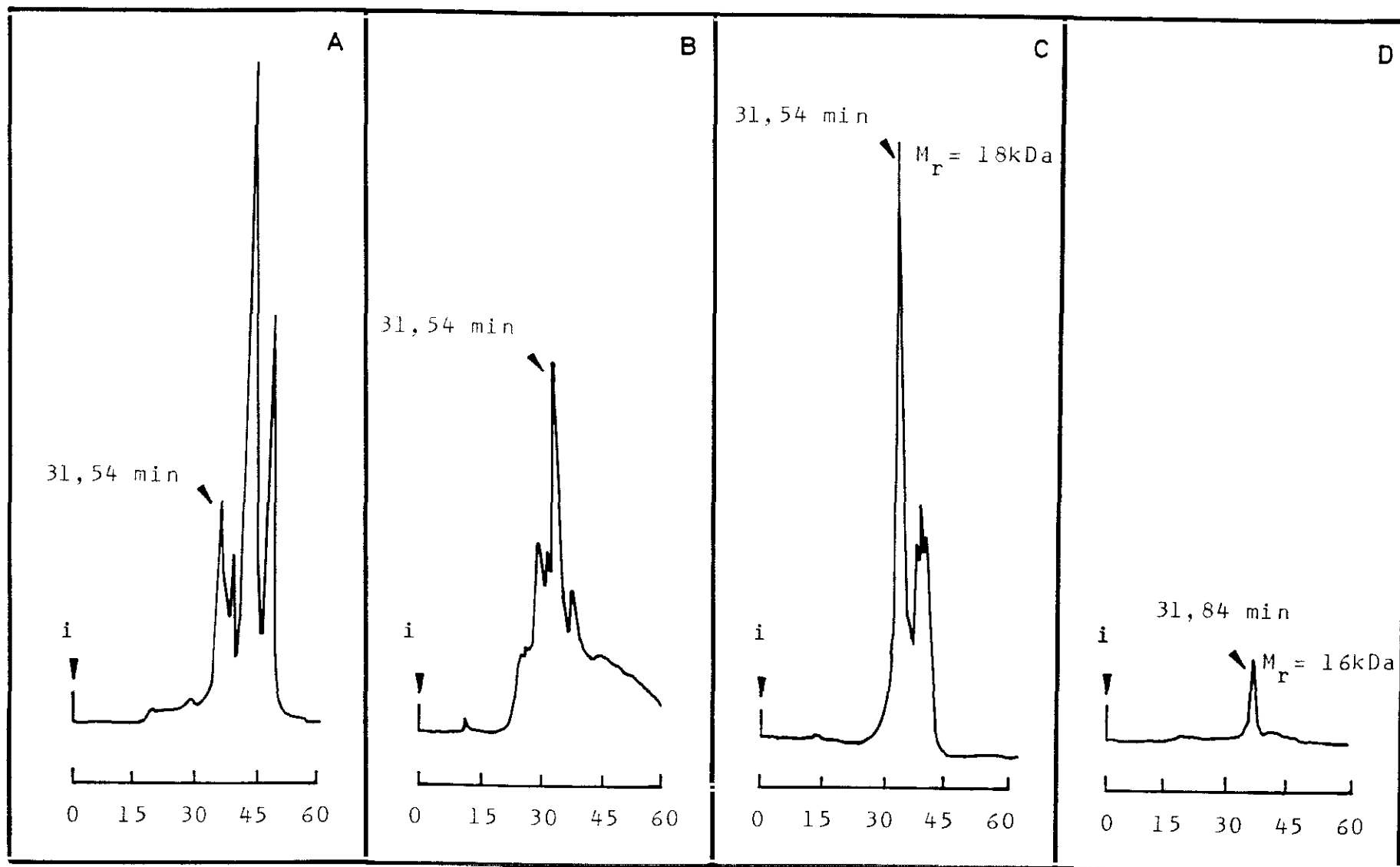
Llegados a este punto podemos suponer que las isoformas I y II de arginasa son la misma proteína, según podemos deducir de su similitud en el punto isoeléctrico ($pI = 5,83$ y $pI = 5,86$, respectivamente) y en el peso molecular ($M_r = 18,0$ kDa y $M_r = 16,0$ kDa). El hecho de que eluyan con diferente fuerza iónica (0,1 M la isoforma I y 2,0 M la isoforma II, de tampón Tris-HCl, pH 9,1) del gel de fosfato cálcico puede deberse a la microheterogeneidad derivada de purificar las enzimas a partir de una amplia población de individuos no clonados.

Desde este momento, nos referiremos siempre a las isoformas I, III y IV de arginasa, entendiendo que la I y II son la misma proteína. Los estudios espectroscópicos, así como los que se comentarán más adelante sobre ligamiento, se referirán a estas tres isoformas.

Tabla IV.- Purificación de las isoformas I y II de arginasa a partir de talos de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1, conteniendo L-arginina 40 mM, durante 6 h en oscuridad.

| | Volumen (ml) | Proteína (mg·ml ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad específica (unidades) | Actividad total (unidades) | Rendimiento (%) | Purificación (veces) |
|--|-----------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Extracto libre de células | 150 | 0,928 | 139,20 | 0,76 | 106,35 | 100 | — |
| Sobrenadante del 85% de precipitación con sulfato amónico | 60 | 0,072 | 4,32 | 24,38 | 105,30 | 99,03 | 31,91 |
| Fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico | 20 | 0,015 | 0,31 | 105,52 | 32,71 | 30,76 | 138,11 |
| Fracción eluida con tampón Tris-HCl 2,0 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico | 20 | 0,004 | 0,08 | 207,50 | 16,60 | 15,60 | 270,94 |
| Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico Fracción de pI 5,86 | 3 | 0,014 | 0,042 | 112,86 | 4,74 | 4,46 | 147,72 |
| Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 2,0 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico Fracción de pI 5,83 | 3 | 0,003 | 0,009 | 275,40 | 2,48 | 2,33 | 359,15 |

Figura 4.- Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular en columna TSK G5000 PWXL, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos, de las distintas fracciones del proceso de purificación de las isoforma I y II de arginasa. En (A), extracto libre de células; en (B), sobrenadante dializado del 85% (p/v) de saturación con sulfato amónico; en (C), fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, del gel de fosfato cálcico y en (D), fracción eluida con tampón Tris-HCl 2,0 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico. Las flechas indican los picos identificado como isoformas I y II. i = inyección.



Tiempo (min)

Figura 5.- Electroenfoque en columna de la isoforma I de arginasa obtenida por desorción del gel de fosfato cálcico con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1. Proteínas (●), pH (○). A.E. indica actividad específica expresada en unidades; la flecha muestra el pI de la fracción correspondiente a la isoforma I.

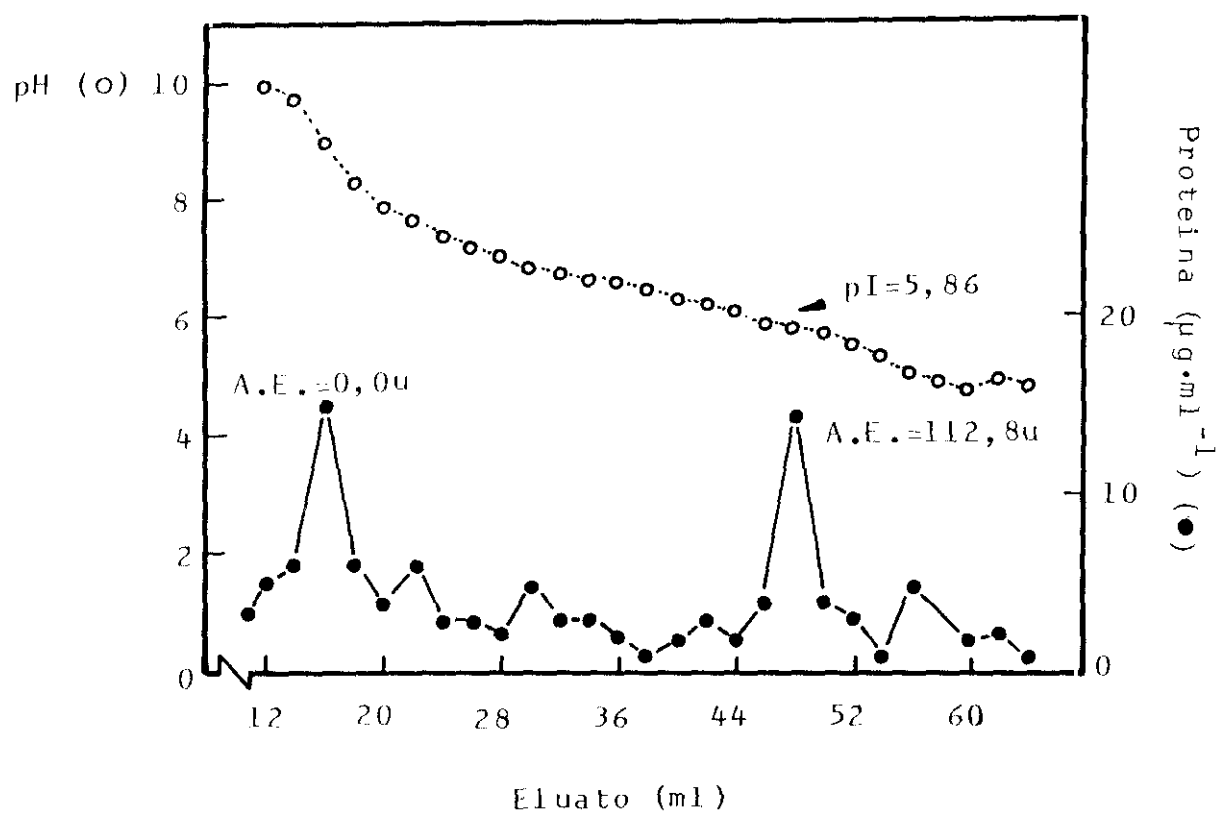


Figura 6.- Electroenfoque en columna de la isoforma II de arginasa obtenida por desorción del gel de fosfato cálcico con tampón Tris-HCl 2,0 M, pH 9,1. Proteínas (●), pH (○). A.E. indica actividad específica expresada en unidades; la flecha muestra el pI de la fracción correspondiente a la isoforma II.

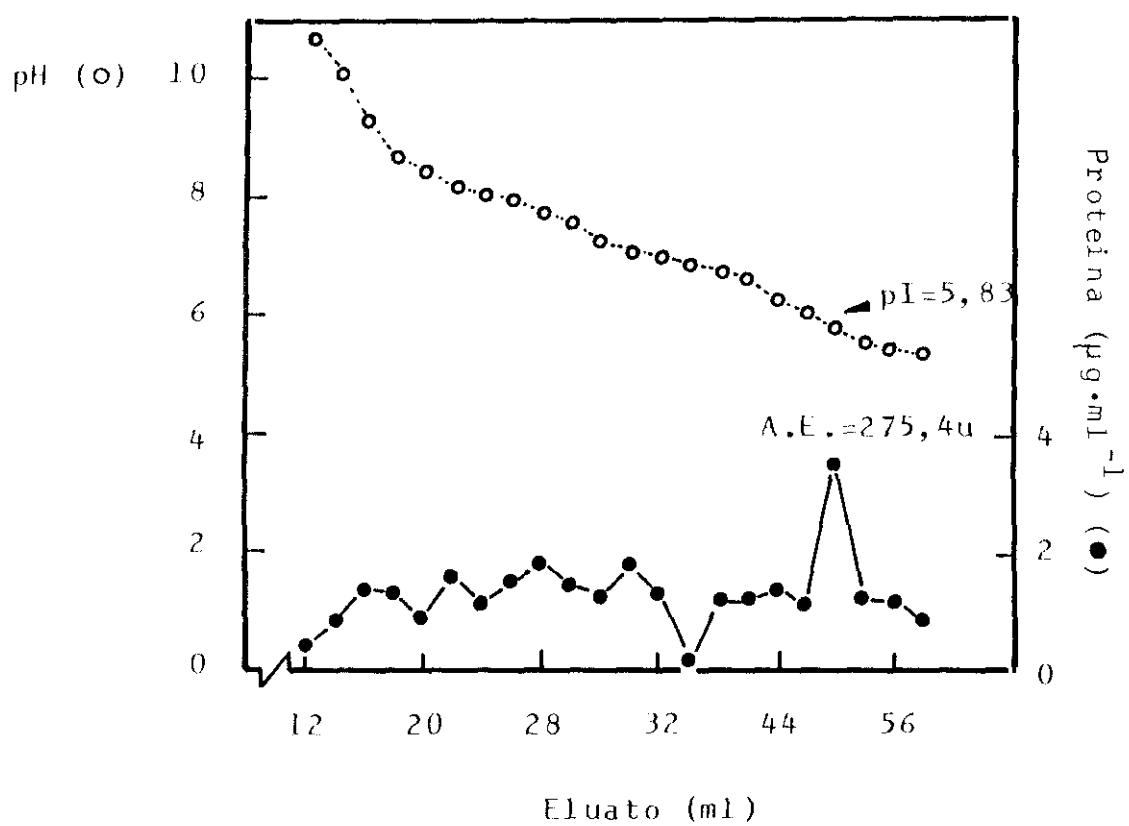


Figura 7.- Representación esquemática de (A), capilar de 75 μm de diámetro interno y (B), capilar de 50 μm de diámetro interno. PI = poliimida; S = sílice fundida.

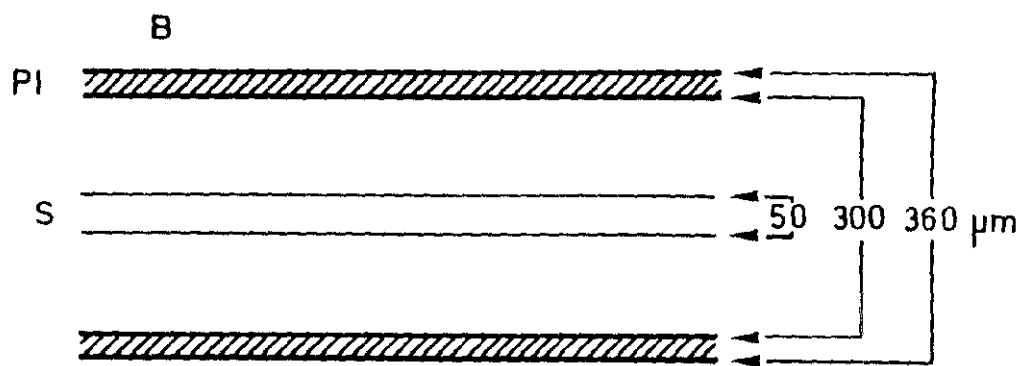
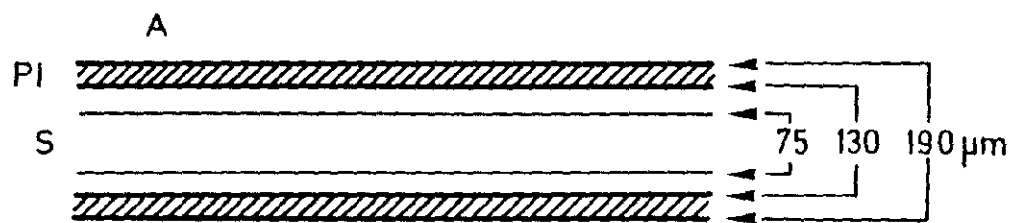


Figura 8.- Anatomía interna de los capilares de sílice fundida vistos a microscopio óptico.

En (a) y (b) capilares de 75 μm de diámetro interno; en (c-l), capilares de 50 μm de diámetro interno. En (a), capilar vacío intacto; en (b), corte correcto del extremo; en (c), corte defectuoso que distorsiona la capa de poliimida; en (d), aspecto del capilar lleno (flecha rellena) y vacío (flecha vacía); de (e) a (k), diferentes irregularidades de la pared interna del capilar; en (l), formación de poro a través de la pared del capilar. PI = poliimida; S = sílice fundida. Las fotografías fueron tomadas con un sistema Nikon Labophot utilizando un objetivo acromático 20x de apertura numérica 0,4 (Ref. 160/0.17, Nikon).

5 μ m

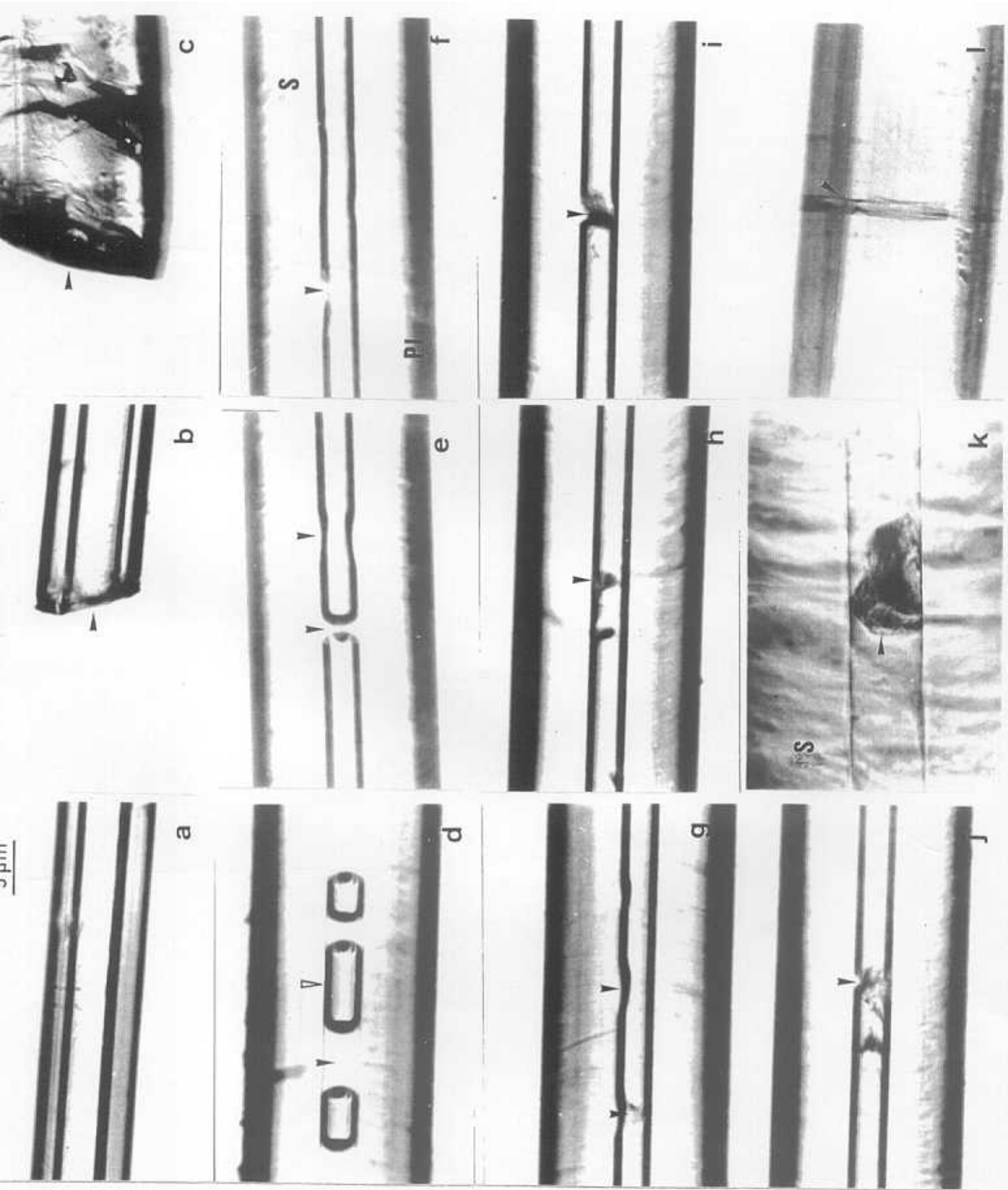
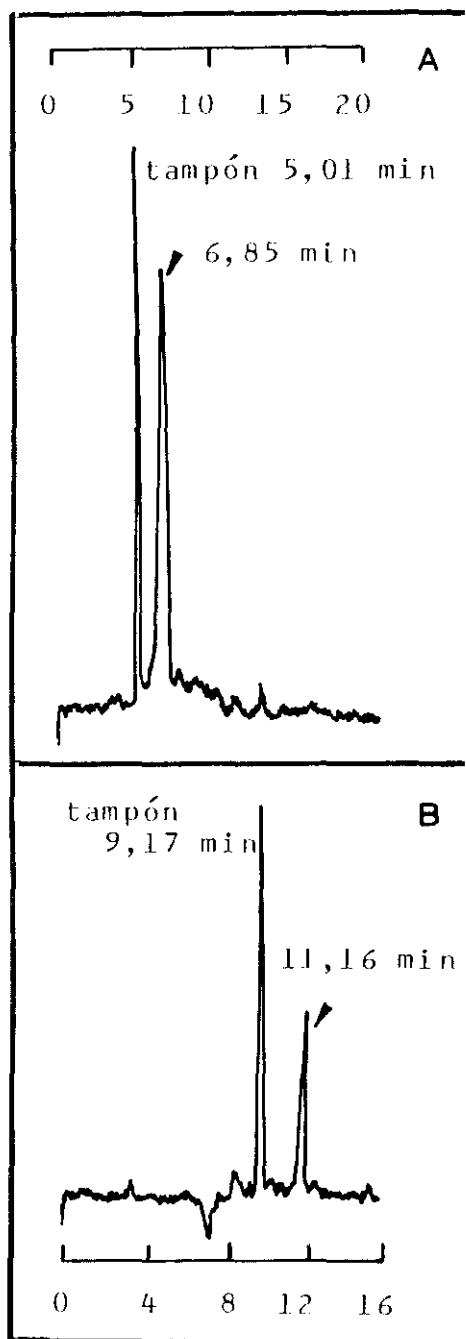


Figura 9.- Electroforegramas de la isoforma I de arginasa obtenidos con tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico pH 7,1 (A) ó con tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0 (B), como electrolito. La electroforesis se llevó a cabo en capilares de sílice fundida de 75 μ m de diámetro interno por 60 cm de longitud (hasta la ventana de detección). La temperatura fue de 30°C y el voltaje aplicado fue de 25 kV en (A) y de 17 kV en (B). Las flechas indican el pico identificado como isoforma I.

Tiempo (min)



Tiempo (min)

Figura 10 - Rectas de calibrado para la determinación del punto isoelectrico en función de la movilidad electroforética (μ_e), construidas con proteínas de pI conocido. La separación de proteínas se obtuvo mediante electroforesis capilar, utilizando como electrolito (A), tampón borato sódico 15 mM/ ácido fosfórico, pH 7,1, a 30°C y 25 kV; $y = -4,23 + 1,06x$; $r = 0,96$. En (B) , el electrolito fue tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0 a 30°C y 17 kV; $y = -3,9 + 0,75x$; $r = 0,99$. El capilar de sílice fundida y 60 cm de longitud. 1 = tiroglobulina (pI = 4,5); 2 = alcohol deshidrogenasa (pI = 5,4); 3 = anhidrasa carbónica (pI = 5,9); 4 = aldolasa (en A) (pI = 6,6), mioglobina (en B) (pI = 7,0); 5 = benzol (pI igual al del electrolito). Las flechas indican la posición de la isoforma I de arginasa (O) en las rectas de calibrado obtenidas a pH 7,1 (A) y pH 9,0 (B).

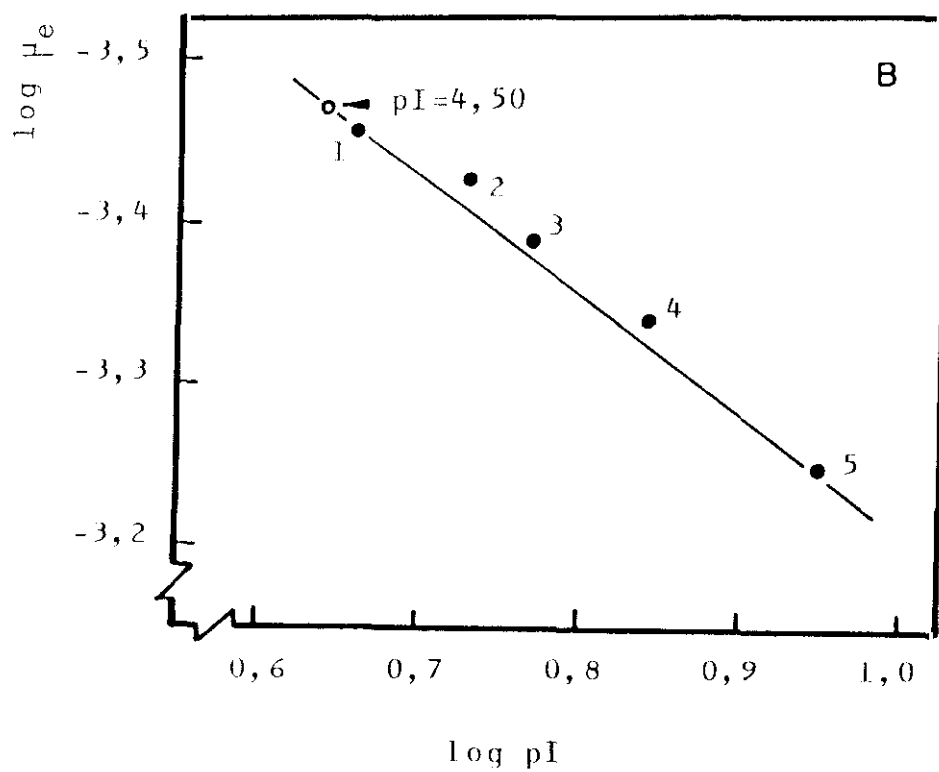
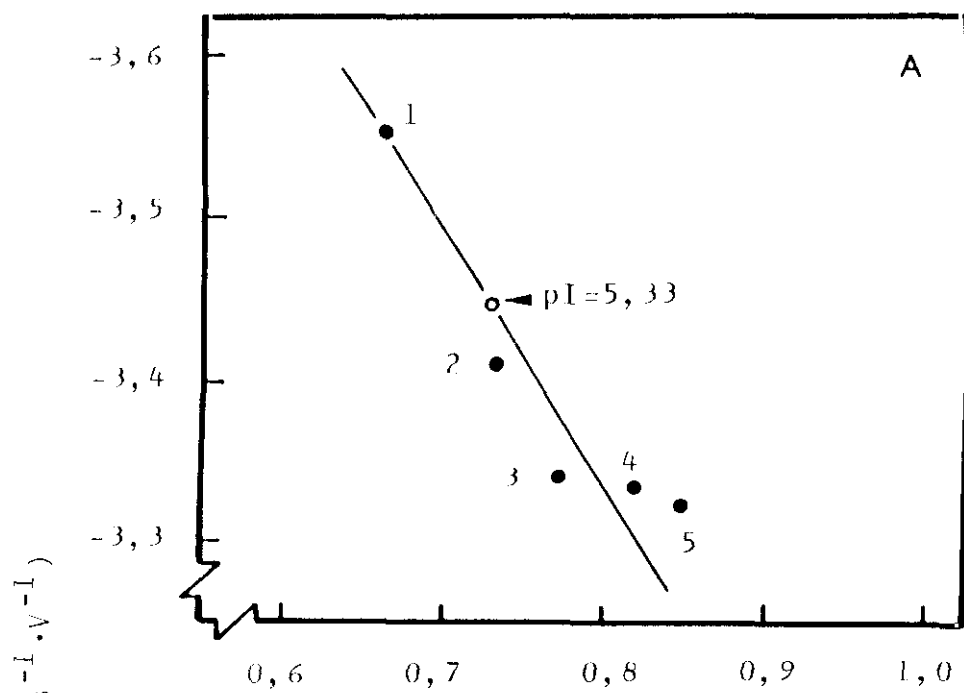


Tabla V.- Composición de aminoácidos de las isoformas I y II de arginasa.

| Aminoácido | Isoforma I | | Isoforma II | |
|------------|------------|-----------|-------------|----------|
| | % moles | Residuos* | moles | Residuos |
| CYS** | 1,3 | 2 | 1,9 | 2 |
| ASX | 11,4 | 17 | 10,4 | 14 |
| THR | 5,2 | 8 | 5,2 | 7 |
| SER | 10,4 | 16 | 6,5 | 9 |
| GLX | 16,6 | 25 | 11,7 | 16 |
| PRO | 4,1 | 6 | 5,2 | 7 |
| GLY | 15,6 | 24 | 11,7 | 16 |
| ALA | 7,3 | 11 | 10,4 | 14 |
| VAL | 4,2 | 7 | 6,1 | 8 |
| MET | 0,9 | 1-2 | 0,8 | 1 |
| ILE | 2,1 | 3 | 4,5 | 6 |
| LEU | 4,2 | 7 | 8,5 | 11 |
| TYR | 1,0 | 2 | 2,9 | 4 |
| PHE | 2,1 | 3 | 2,9 | 4 |
| HIS | 1,0 | 2 | 2,2 | 3 |
| LYS | 4,2 | 6 | 6,8 | 9 |
| ARG | 8,4 | 13 | 3,5 | 5 |
| TRP*** | | 1 | | 3 |

* El número de residuos se expresa como el valor entero más próximo, asumiendo un peso molecular de 18.000 y 16.000 Da para las isoformas I y II, respectivamente.

** Determinado como ácido cisteico.

*** Determinado espectrofotométricamente por el método de Beaven-Holiday.

Figura 11.- Cromatograma obtenido mediante HPLC de exclusión molecular de proteínas patrón de peso molecular conocido. Columna TSK G5000 PWXL (300 mm x 7,8 mm de d.i.). Fase móvil, tampón Tris-HCl 75 mM, pH 9,1; flujo 0,3 ml.min⁻¹; detección UV a 280 nm. 1 = Tiroglobulina (M_r=660 kDa); 2 = Apoferritina (M_r=440 kDa); 3 = β -amilasa (M_r=200 kDa); 4 = Albúmina (M_r=67 kDa); 5 = Anhidrasa carbónica (M_r=29 kDa) y 6 = Citocromo c (M_r=12,4 kDa).

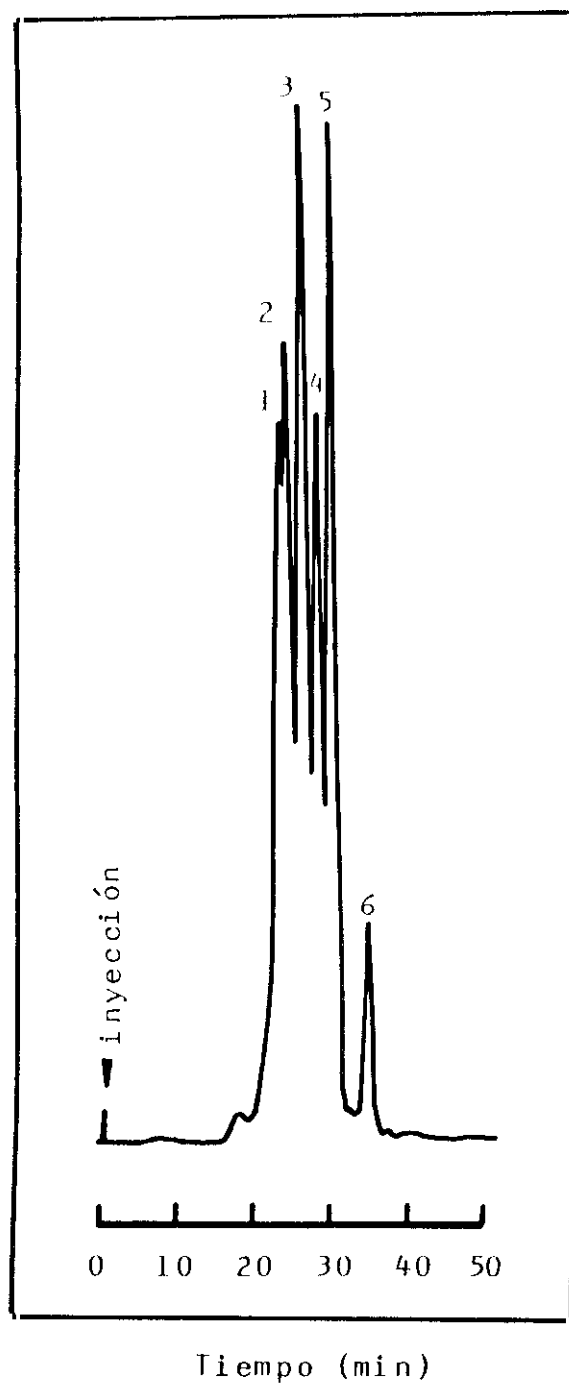
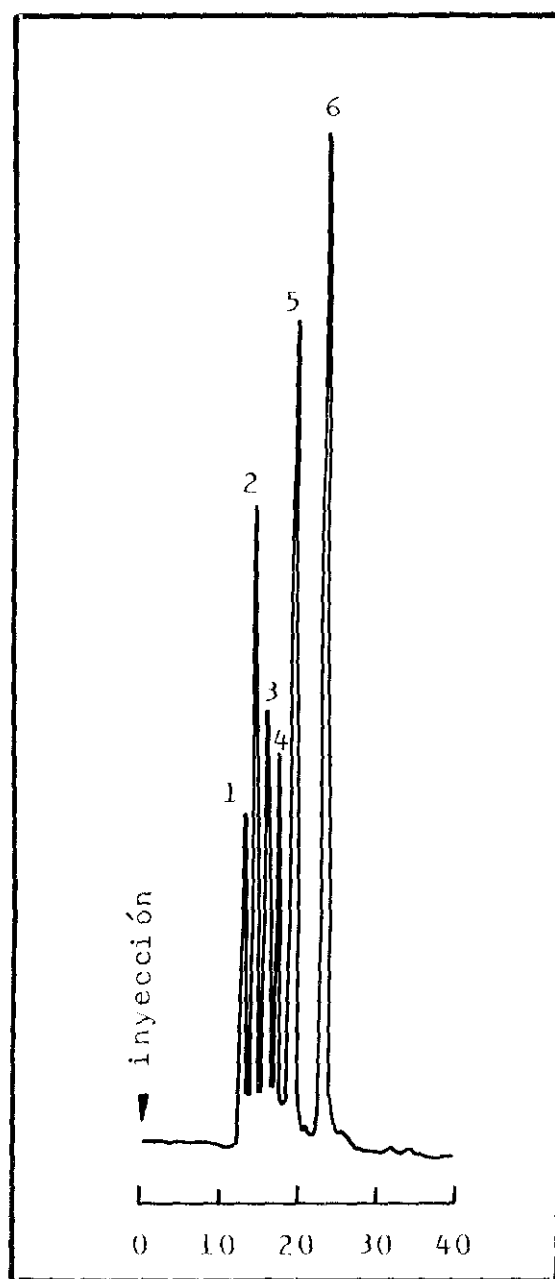


Figura 12.- Cromatograma obtenido mediante HPLC de exclusión molecular de proteínas patrón de peso molecular conocido. Columnas Zorbax GF450-GF250, 2 x (250 mm x 9,4 mm d.i.). Fase móvil, tampón Tris-HCl 200 mM, pH 8,5; flujo 1,0 ml.min⁻¹; detección UV a 280 nm. 1 = Tiroglobulina (M_r=660 kDa); 2 = Apoferritina (M_r=440 kDa); 3 = β-amilasa (M_r=200 kDa); 4 = Albúmina (M_r=67 kDa); 5 = Anhidrasa carbónica (M_r=29 kDa) y 6 = Citocromo c (M_r=12,4 kDa).



Tiempo (min)

Tabla VI.- Eficacia de las columnas TSK G5000 PWXL y Zorbax-diol GF450 en serie con Zorbax-diol GF 250, analizada como número de platos teóricos (N) para los picos de tiroglobulina y citocromo c (números 1 y 6 en los cromatogramas de las Figuras 11 y 12, respectivamente). Condiciones de análisis descritas en el apartado II.8. de Material y Métodos.

| Columna(s) | Proteína | N* |
|---------------------------|---------------|---------------|
| TSK G5000 PWXL | Tiroglobulina | 107.904 ± 650 |
| | Citocromo c | 85.931 ± 730 |
| Zorbax GF450-Zorbax GF250 | Tiroglobulina | 163.592 ± 593 |
| | Citocromo c | 108.484 ± 687 |

* N fue calculado mediante la expresión $16 \cdot (t_r/w_b)^2$

Figura 13.- Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular de SDS al 1% (p/v) (A), de la isoforma I de arginasa nativa (B) y desnaturalizada con SDS al 1% (p/v) (C). Columnas Zorbax GF450-GF250, 2 x (250 mm x 9,4 mm d.i.); fase móvil, tampón Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, conteniendo SDS al 1% (p/v); flujo 1 ml.min⁻¹; detección UV a 280 nm. Las flechas rellenas indican el pico identificado como isoforma I de arginasa y las flechas vacías el agregado de SDS. i = inyección.

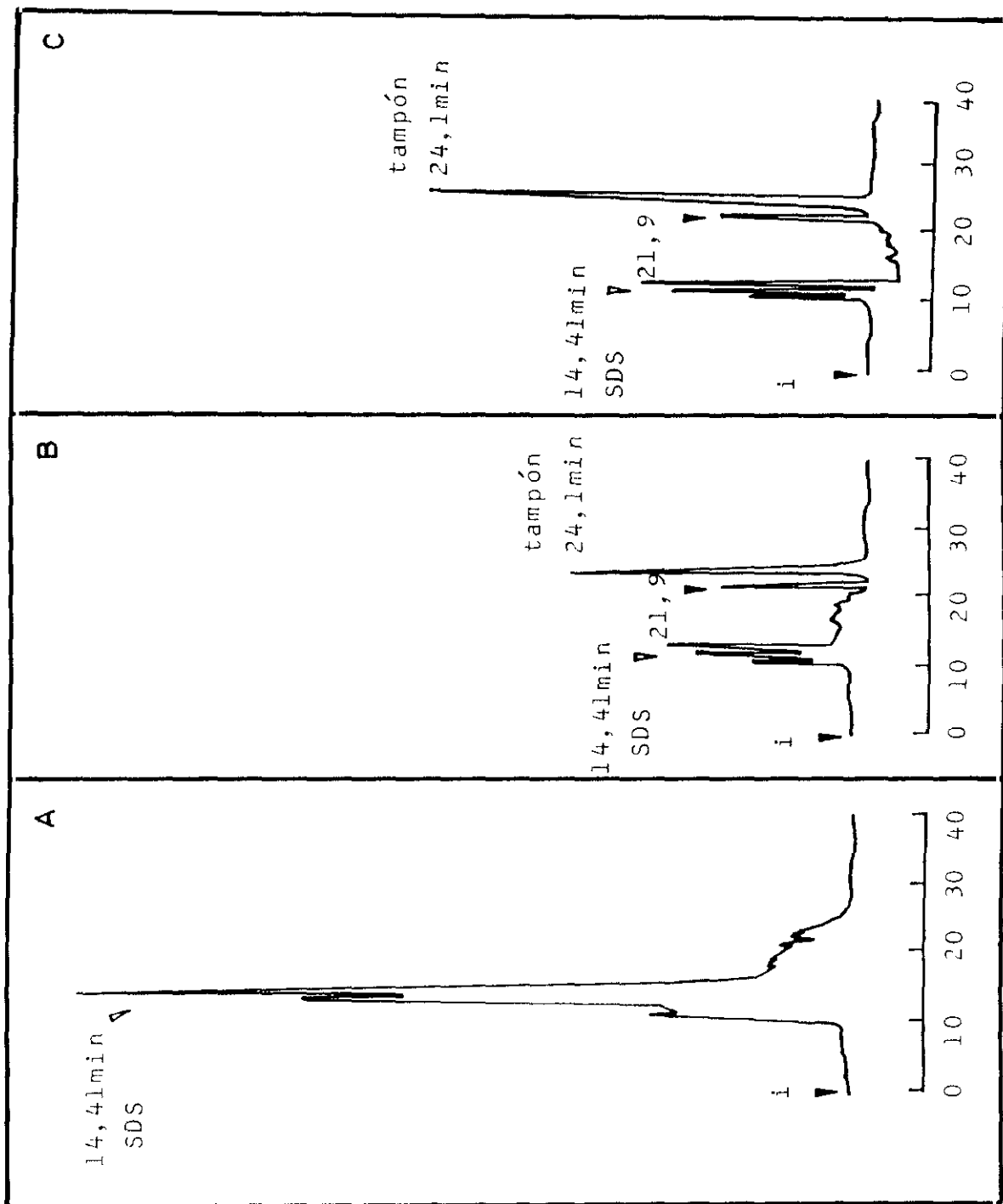


Figura 14 - Rectas de calibrado para la determinación del peso molecular en función del volumen de elución relativo, construidas con proteínas de M_r conocida. La separación de proteínas se obtuvo mediante HPLC de exclusión molecular, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. En (A), columna TSK G5000 PWXL; $y = 6,49 - 8,65x$; $r = 0,98$. En (B), dos columnas Zorbax-diol GF450-GF250, conectadas en serie; $y = 6,43 - 8,74x$; $r = 0,98$. 1 = tiroglobulina ($M_r = 660$ kDa); 2 = apoferritina ($M_r = 440$ kDa); 3 = β -amilasa ($M_r = 200$ kDa); 4 = albúmina de huevo ($M_r = 67$ kDa); 5 = anhidrasa carbónica ($M_r = 29$ kDa); 6 = citocromo c ($M_r = 12,4$ kDa). Las flechas indican la posición de las isoformas I (O) y II (●) de arginasa en las rectas de calibrado.

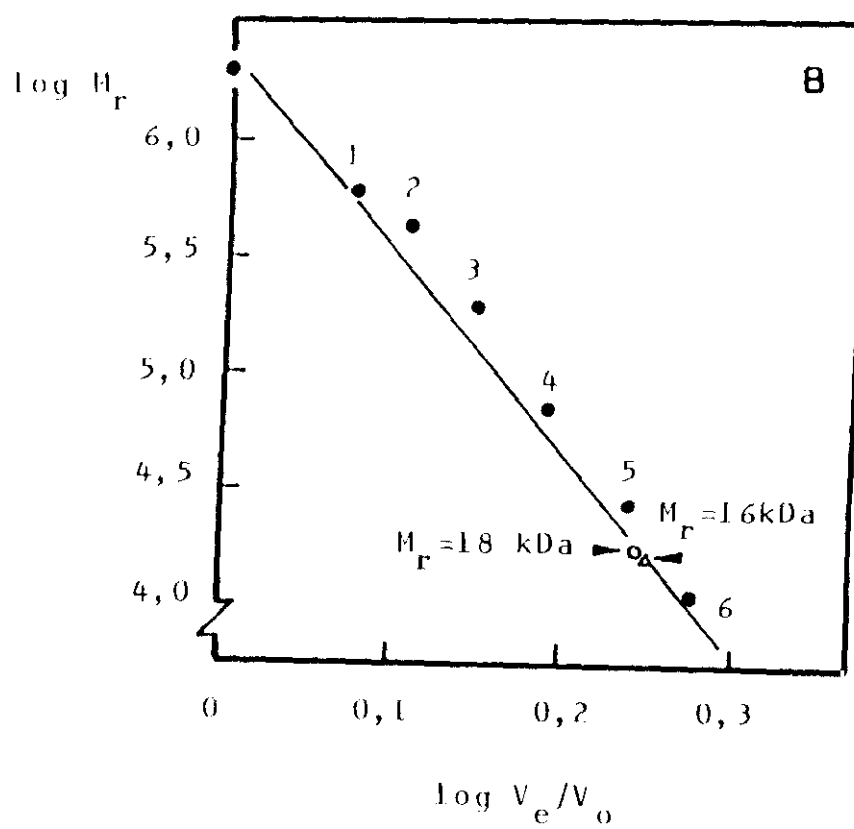
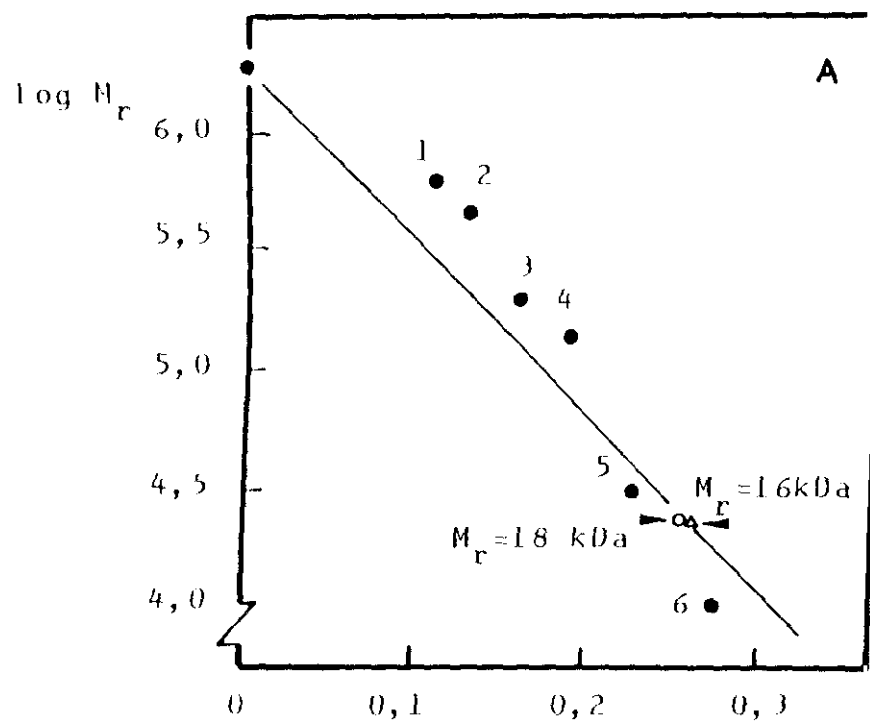
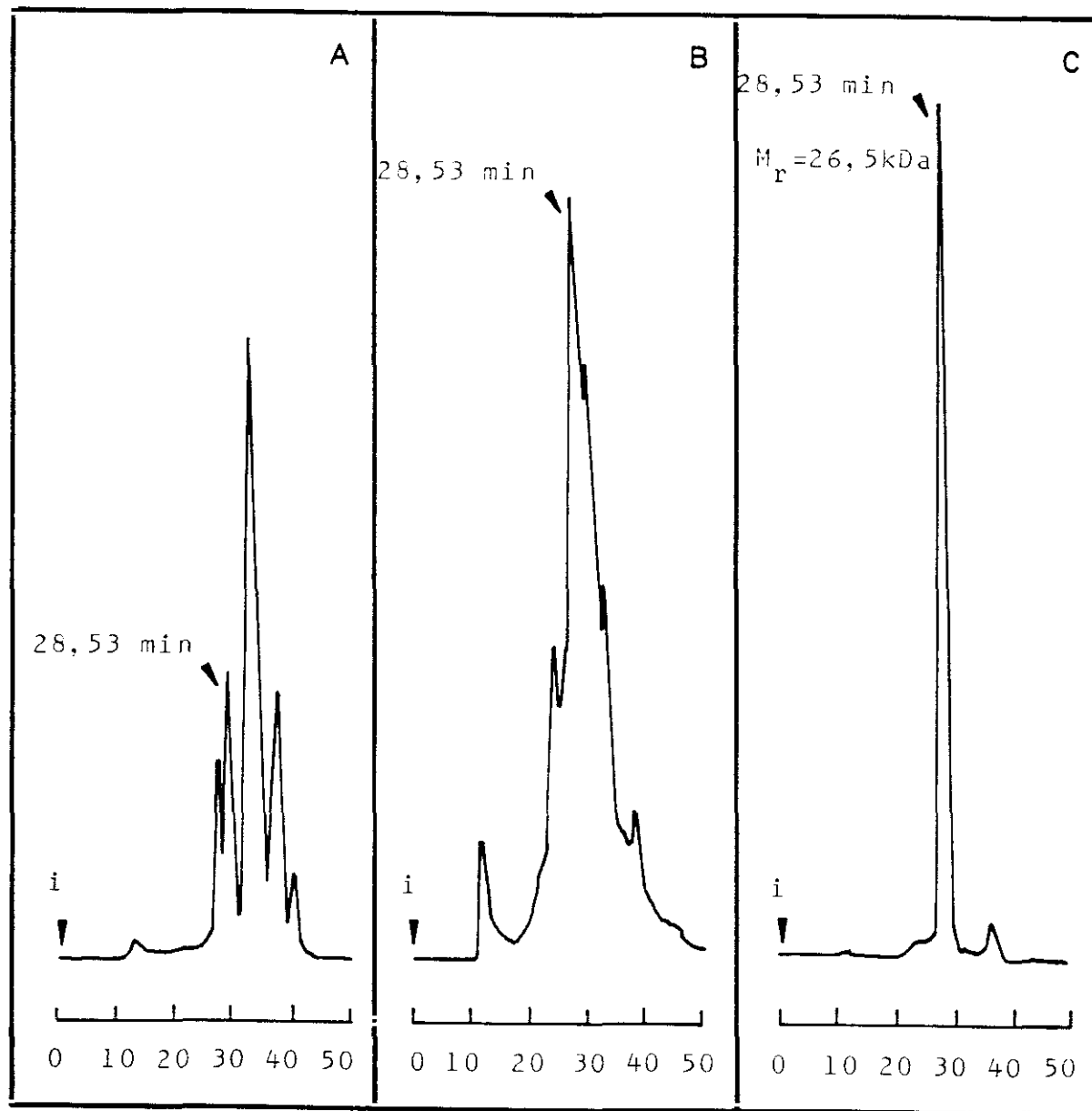


Tabla VII.- Purificación de la isoforma III de arginasa a partir de talos de *E. prunastri* incubados en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 6,5, conteniendo cicloheximida 40 μ M, durante 16 h en oscuridad

| | Volumen (ml) | Proteína (mg·ml ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad especifica (unidades) | Actividad total (unidades) | Rendimiento (%) | Purificación (veces) |
|--|-----------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Extracto libre de células | 150 | 8,550 | 1282,80 | 0,25 | 326,96 | 100 | — |
| Sobrenadante del 70% de precipitación con sulfato amónico | 62 | 0,200 | 12,40 | 10,37 | 128,58 | 39,32 | 40,66 |
| Fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5 del gel de fosfato cálcico | 20 | 0,120 | 2,40 | 30,50 | 73,34 | 22,43 | 119,84 |
| * Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5 del gel de fosfato cálcico. Fracción de pI 6,18 | 3 | 0,025 | 0,07 | 66,06 | 4,95 | 1,52 | 259,05 |
| Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5 del gel de fosfato cálcico. Fracción de pI 4,68 | 3 | 0,060 | 0,18 | 11,25 | 2,03 | 0,62 | 44,12 |

* Fracción del electroenfoque en columna elegida como isoforma III de arginasa

Figura 15.- Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular en columna TSK G5000 PWXL, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos, de las distintas fracciones del proceso de purificación de la isoforma III de arginasa. En (A), extracto libre de células; en (B), sobrenadante dializado del 70% (p/v) de saturación con sulfato amónico y en (C), fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5 del gel de fosfato cálcico. Las flechas indican el pico identificado como isoforma III. i = inyección.



Tiempo (min)

Figura 16.- Electroenfoque en columna de la isoforma III de arginasa obtenida por desorción del gel de fosfato cálcico con tampón Tris-HCl 0,16 M, pH 6,5. Proteínas (●), pH (○). A.E. indica actividad específica expresada en unidades; la flecha muestra el pI de la fracción correspondiente a la isoforma III.

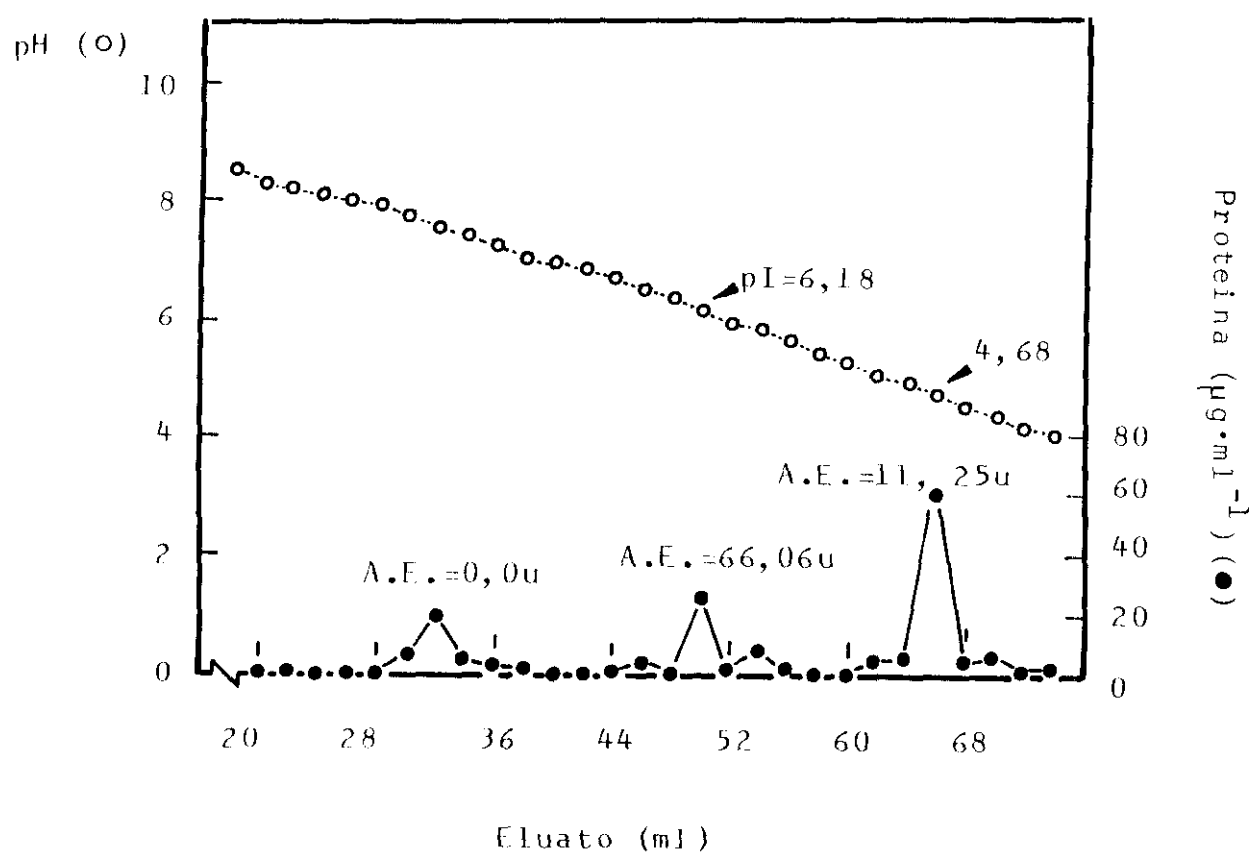


Figura 17.- Electroforegramas de la isoforma III de arginasa obtenidos con tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico, pH 7,1 (A) o con tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0, (B), como electrolito. La electroforesis se llevó a cabo en capilares de sílice fundida de 75 μ m de diámetro interno por 60 cm de longitud (hasta la ventana de detección). La temperatura fue de 30°C y el voltaje aplicado fue de 25 kV en (A) y de 17 kV en (B). Las flechas indican el pico identificado como isoforma III.

Tiempo (min)

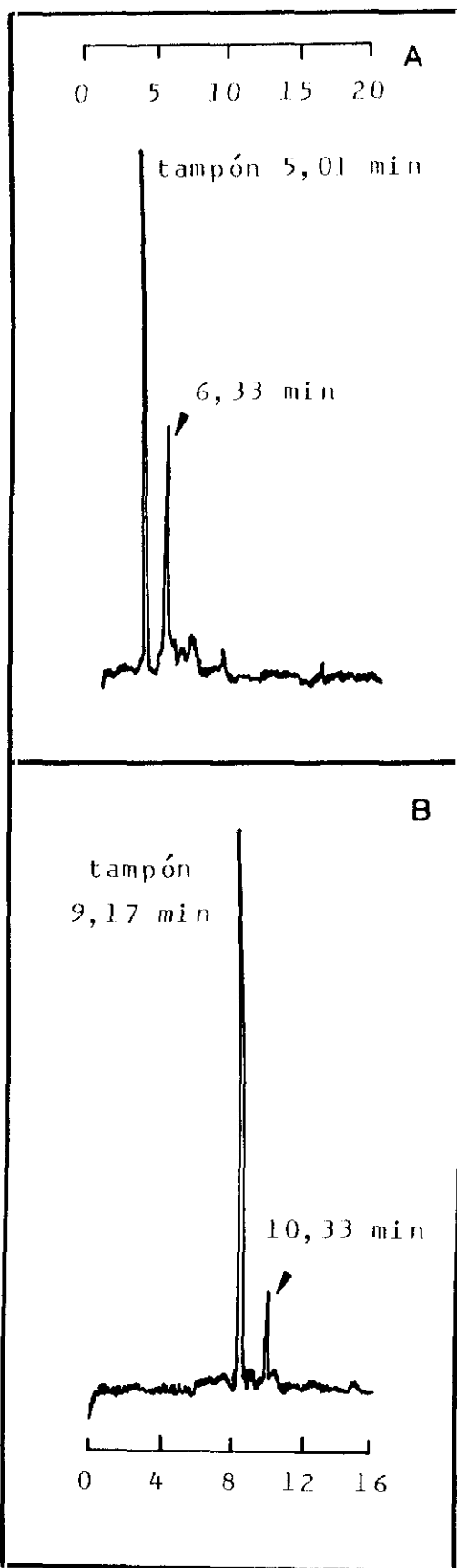


Figura 18.- Rectas de calibrado para la determinación del punto isoelectrico en función de la movilidad electroforética (μ_e), construidas con proteínas de pI conocido. La separación de proteínas se obtuvo mediante electroforesis capilar, utilizando como electrolito (A), tampón borato sódico 15 mM/ ácido fosfórico, pH 7,1, a 30°C y 25 kV; $y = -4,23 + 1,06x$; $r = 0,96$. En (B) , el electrolito fue tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0 a 30°C y 17 kV; $y = -3,9 + 0,75x$; $r = 0,99$. El capilar, de sílice fundida y 60 cm de longitud. 1 = tiroglobulina (pI = 4,5); 2 = alcohol deshidrogenasa (pI = 5,4); 3 = anhidrasa carbónica (pI = 5,9); 4 = aldolasa (en A) (pI = 6,6), mioglobina (en B) (pI = 7,0); 5 = benzol (pI igual al del electrolito). Las flechas indican la posición de la isoforma III de arginasa (O) en las rectas de calibrado obtenidas a pH 7,1 (A) y pH 9,0 (B).

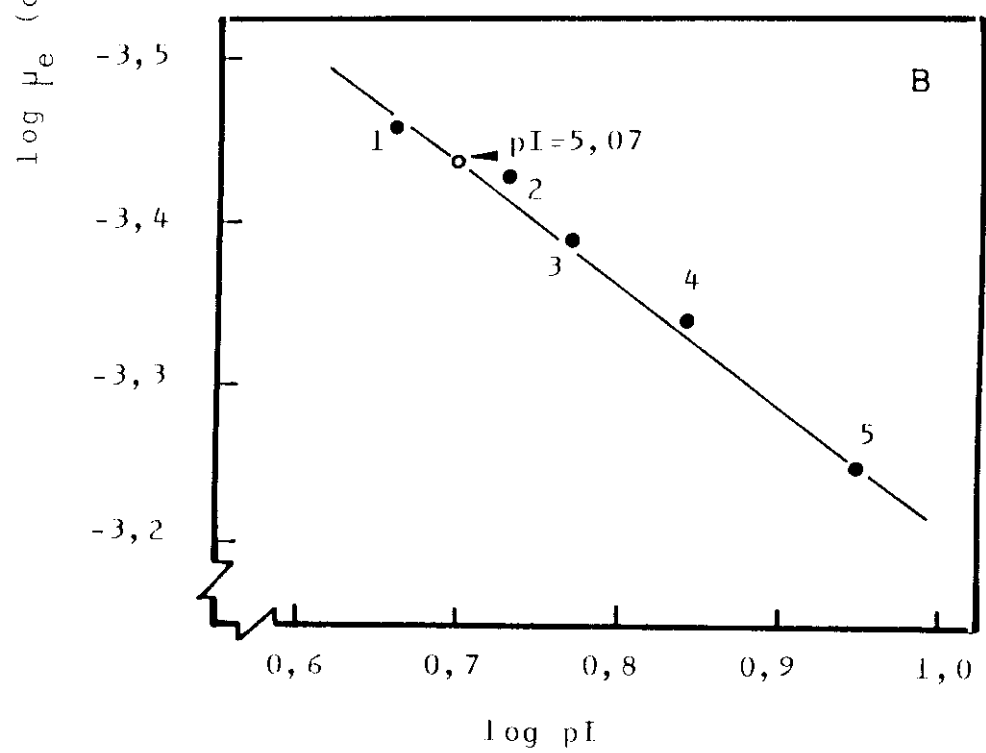
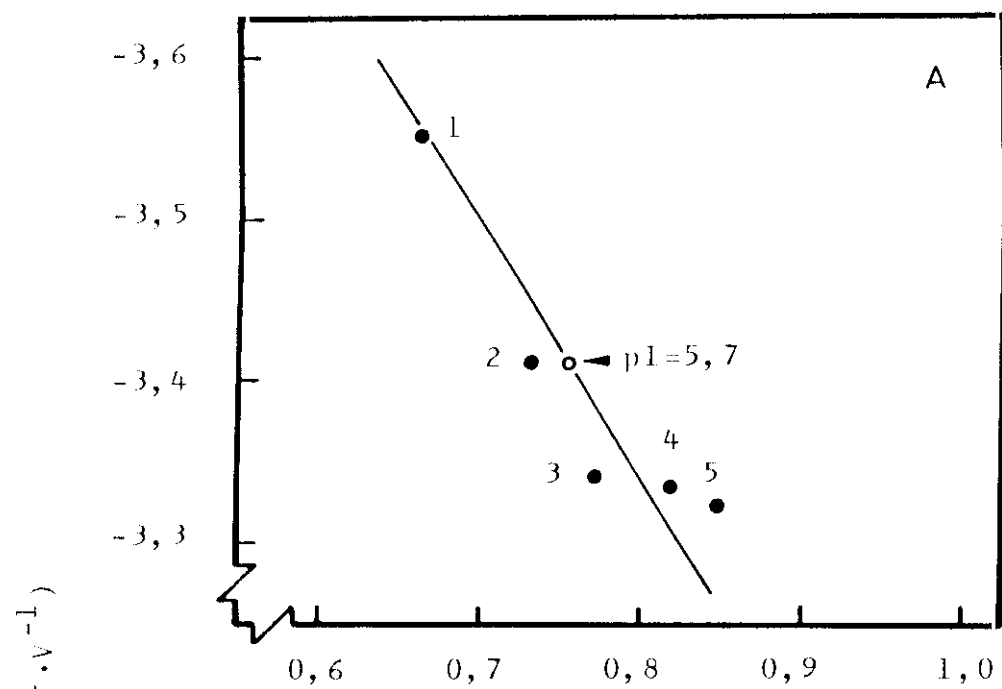


Tabla VIII.- Composición de aminoácidos de la isoforma III de arginasa

| Aminoácido | % moles | Residuos* |
|------------|---------|-----------|
| CYS** | 2,7 | 6 |
| ASX | 10,3 | 22 |
| THR | 4,3 | 9 |
| SER | 6,6 | 15 |
| GLX | 13,4 | 28 |
| PRO | 4,5 | 9 |
| GLY | 11,2 | 29 |
| ALA | 8,7 | 18 |
| VAL | 6,6 | 14 |
| MET | 2,4 | 5 |
| ILE | 3,7 | 8 |
| LEU | 7,2 | 15 |
| TYR | 2,8 | 6 |
| PHE | 3,1 | 7 |
| HIS | 2,1 | 5 |
| LYS | 5,3 | 11 |
| ARG | 4,7 | 10 |
| TRP*** | | 9 |

* El número de residuos se expresa como el valor entero más próximo asumiendo un peso molecular de 26.000 Da.

** Determinado como ácido cistéico.

*** Determinado espectrofotométricamente por el método de Beaven-Holiday

Figura 19.- Rectas de calibrado para la determinación del peso molecular en función del volumen de elución relativo, construidas con proteínas de M_r conocida. La separación de proteínas se obtuvo mediante HPLC de exclusión molecular, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. En (A), columna TSK G5000 PWXL; $y = 6,49 - 8,65x$; $r = 0,98$. En (B), dos columnas Zorbax-diol GF450-GF250, conectadas en serie; $y = 6,43 - 8,74x$; $r = 0,98$. 1 = tiroglobulina ($M_r = 660$ kDa); 2 = apoferritina ($M_r = 440$ kDa); 3 = β -amilasa ($M_r = 200$ kDa); 4 = albúmina de huevo ($M_r = 47$ kDa); 5 = anhidrasa carbónica ($M_r = 29$ kDa); 6 = citocromo c ($M_r = 12,4$ kDa). Las flechas indican la posición de la isoforma III (O) de arginasa en las rectas de calibrado.

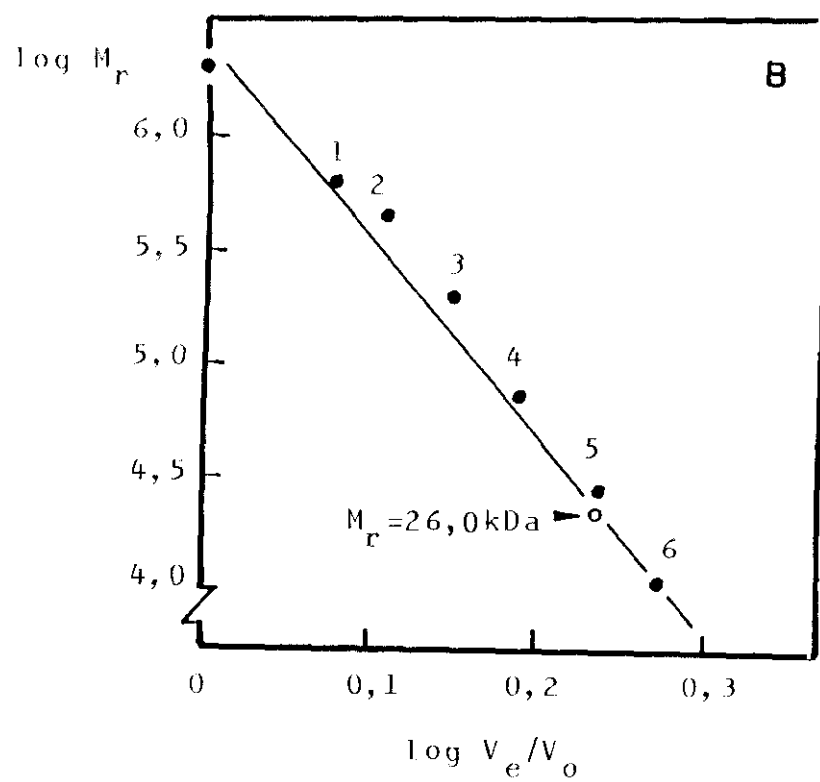
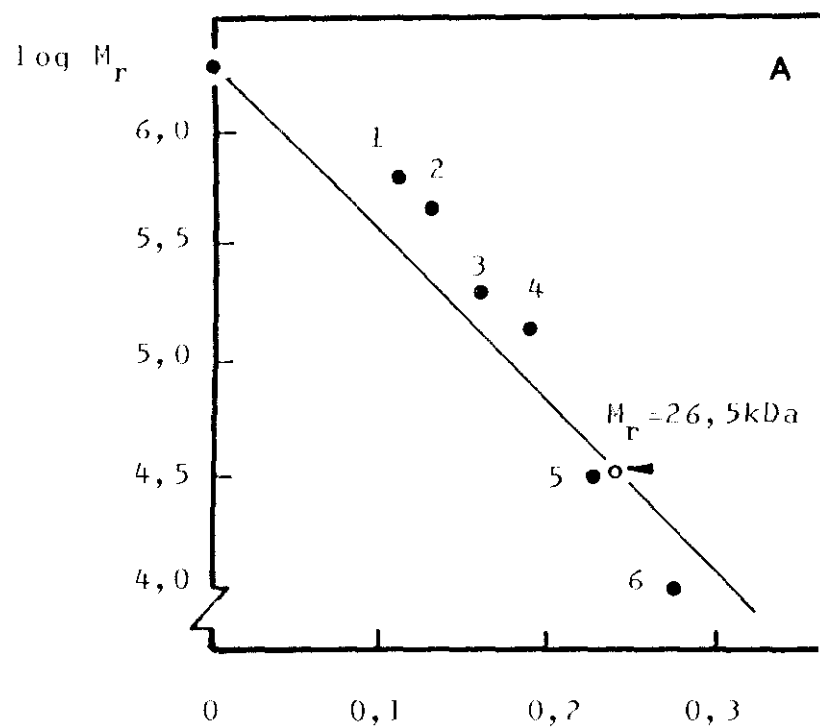
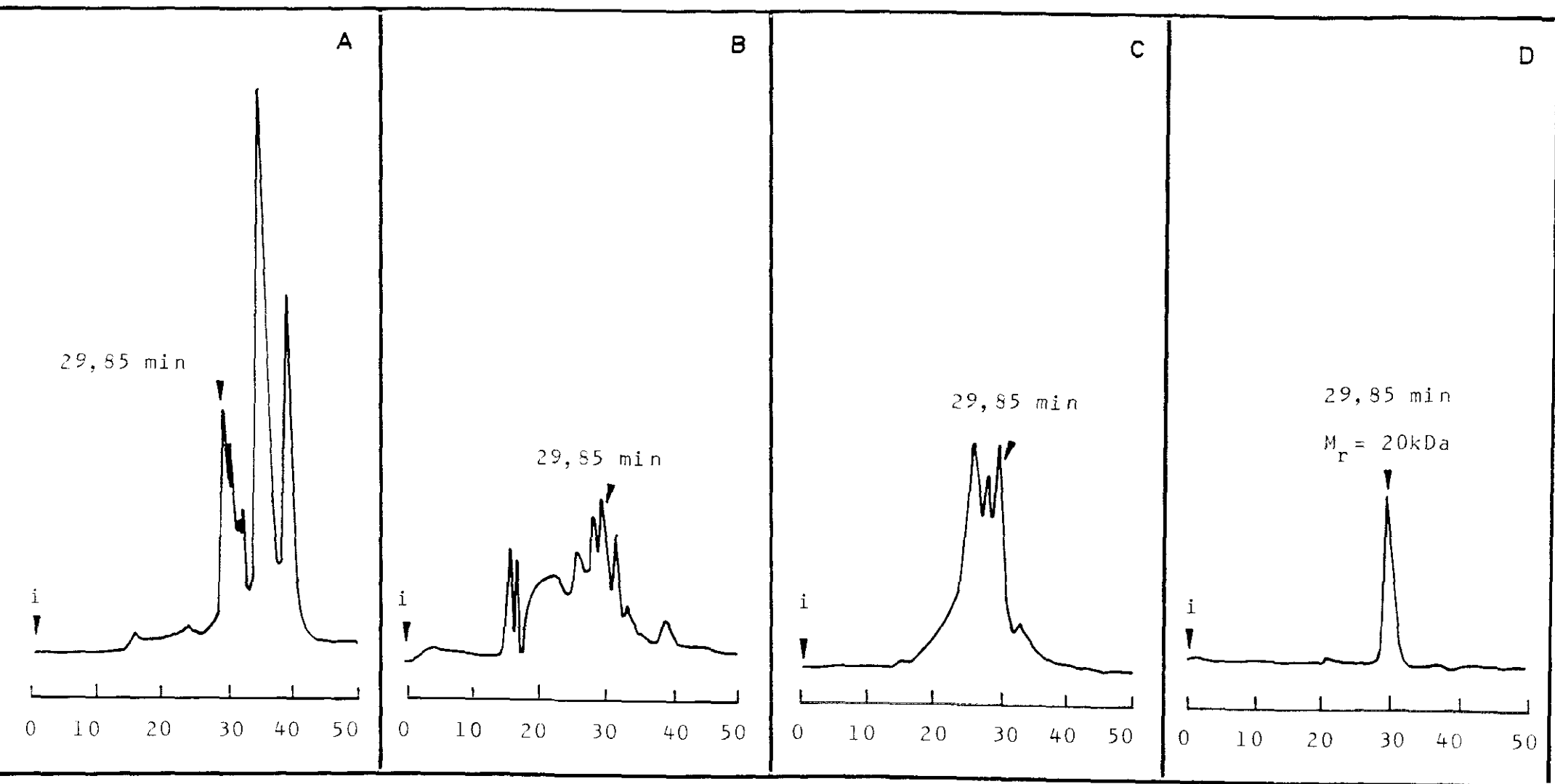


Tabla IX.- Purificación de la isoforma IV de arginasa a partir de talos de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 10 mM. pH 9,1, conteniendo L-arginina 40 mM. durante 8 h en oscuridad

| | Volumen (ml) | Proteína (mg·ml ⁻¹) | Proteína total (mg) | Actividad específica (unidades) | Actividad total (unidades) | Rendimiento (%) | Purificación (veces) |
|--|-----------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Medio de incubación | 300 | 6,634 | 1990,20 | 0,20 | 398,04 | 100 | — |
| Sobrenadante del 50% de precipitación con sulfato amónico | 75 | 0,221 | 16,57 | 20,89 | 346,25 | 86,98 | 104,45 |
| Fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico | 45 | 0,030 | 1,35 | 68,89 | 93,00 | 23,36 | 344,45 |
| Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico. Fracción de pI 8,30 | 3 | 0,035 | 0,105 | 26,17 | 2,75 | 0,69 | 130,85 |
| Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico. Fracción de pI 7,90 | 3 | 0,012 | 0,036 | 9,57 | 0,34 | 0,08 | 47,85 |
| * Electroenfoque de la fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1 del gel de fosfato cálcico. Fracción de pI 5,60 | 3 | 0,060 | 0,180 | 123,20 | 22,17 | 5,57 | 616,00 |

* Fracción del electroenfoque en columna elegida como isoforma IV de arginasa

Figura 20.- Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular en columna TSK G5000 PWXL, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8. de Material y Métodos, de las distintas fracciones del proceso de purificación de la isoforma IV de arginasa. En (A), extracto libre de células; en (B), sobrenadante dializado del 50% (p/v) de saturación con sulfato amónico; en (C), fracción eluida con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1, del gel de fosfato cálcico; en (D), fracción eluida del electroenfoque en columna a pH 5,5. Las flechas indican el pico identificado como isoforma IV. i = inyección.



Tiempo (min)

Figura 21.- Electroenfoque en columna de la isoforma IV de arginasa obtenida por desorción del gel de fosfato cálcico con tampón Tris-HCl 0,14 M, pH 9,1. Proteínas (●), pH (○). A.E. indica actividad específica expresada en unidades; la flecha muestra el pI de la fracción correspondiente a la isoforma IV.

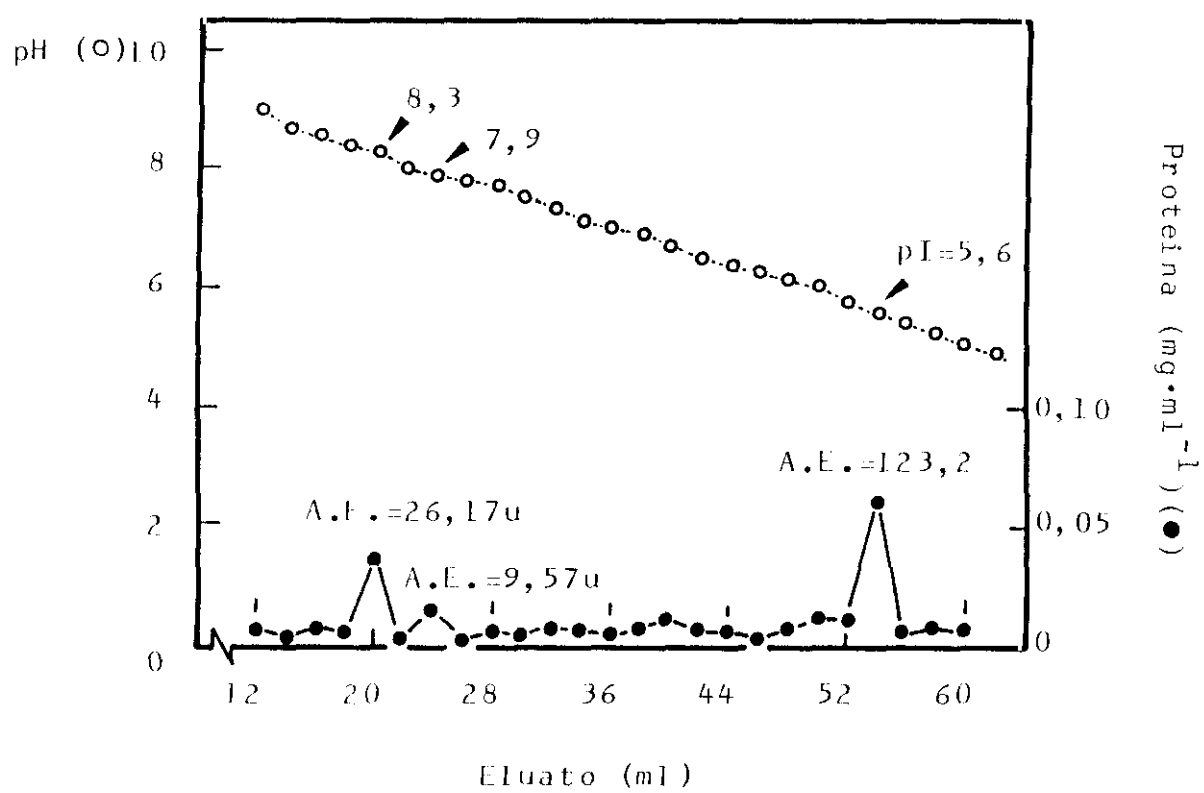
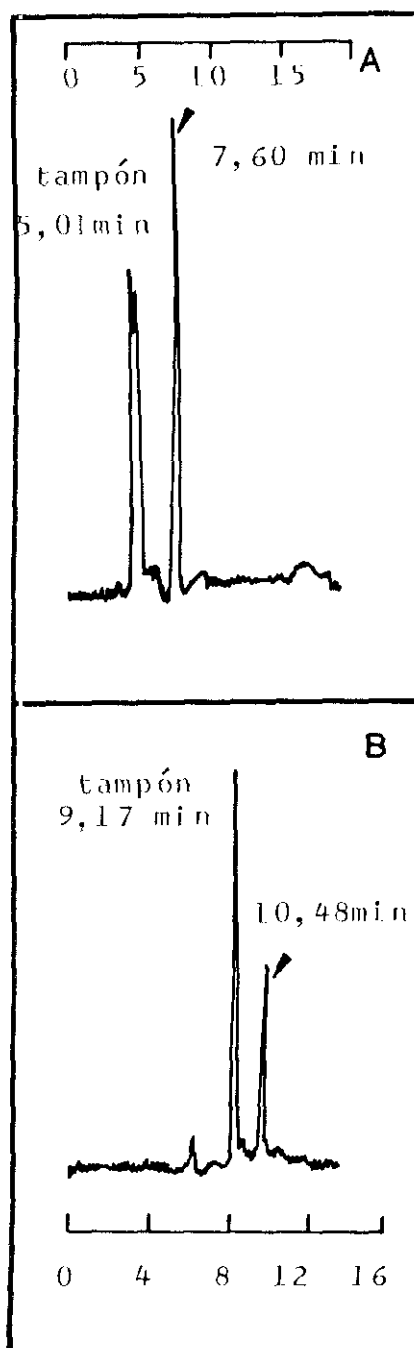


Figura 22.- Electroforegramas de la isoforma IV de arginasa obtenidos con tampón borato sódico 15 mM/ácido fosfórico pH 7,1 (A) o con tampón borato sódico 25 mM pH 9,0 (B), como electrolito. La electroforesis se llevó a cabo en capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno por 60 cm de longitud (hasta la ventana de detección). La temperatura fue de 30°C y el voltaje aplicado fue de 25 kV en (A) y de 17 kV en (B). Las flechas indican el pico identificado como isoforma IV.

Tiempo (min)



Tiempo (min)

Figura 23.- Rectas de calibrado para la determinación del punto isoelectrico en función de la movilidad electroforética (μ_e), construidas con proteínas de pI conocido. La separación de proteínas se obtuvo mediante electroforesis capilar, utilizando como electrolito (A) tampón borato sódico 15 mM/ ácido fosfórico, pH 7,1, a 30°C y 25 kV; $y = -4,23 + 1,06x$; $r = 0,96$. En (B) , el electrolito fue tampón borato sódico 25 mM, pH 9,0 a 30°C y 17 kV; $y = -3,9 + 0,75x$; $r = 0,99$. El capilar, de sílice fundida y 60 cm de longitud. 1 = tiroglobulina (pI = 4,5); 2 = alcohol deshidrogenasa (pI = 5,4); 3 = anhidrasa carbónica (pI = 5,9); 4 = aldolasa (en A) (pI = 6,6), mioglobina (en B) (pI = 7,0); 5 = benzol (pI = al del electrolito). Las flechas indican la posición de la isoforma IV de arginasa (O) en las rectas de calibrado obtenidas a pH 7,1 (A) y pH 9,0 (B).

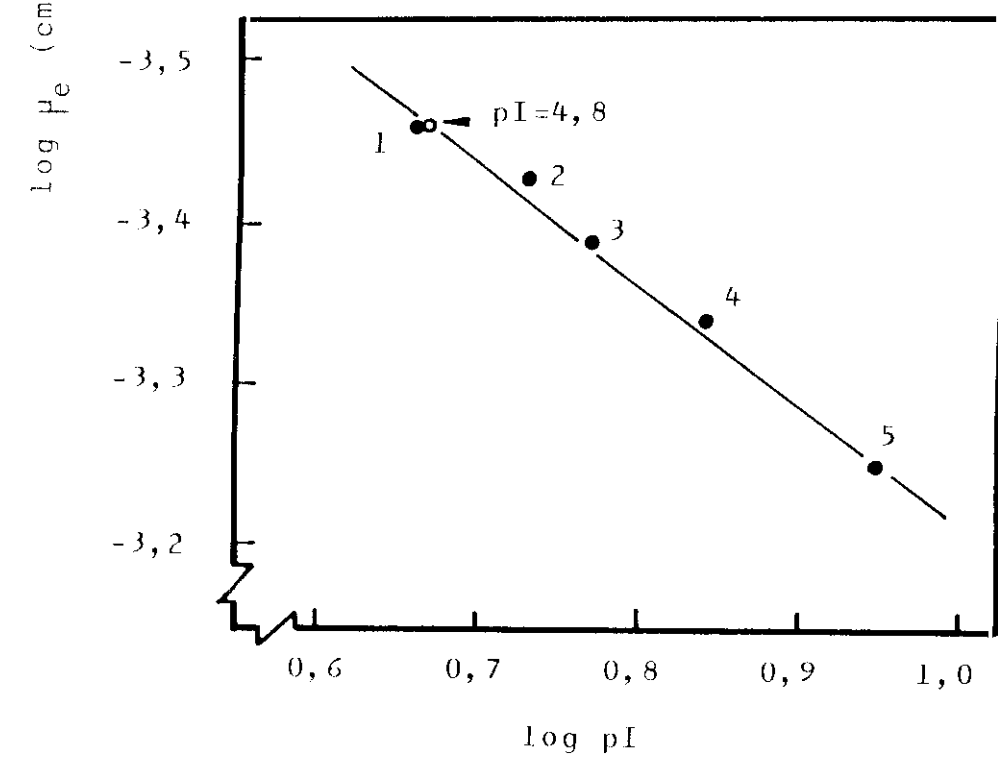
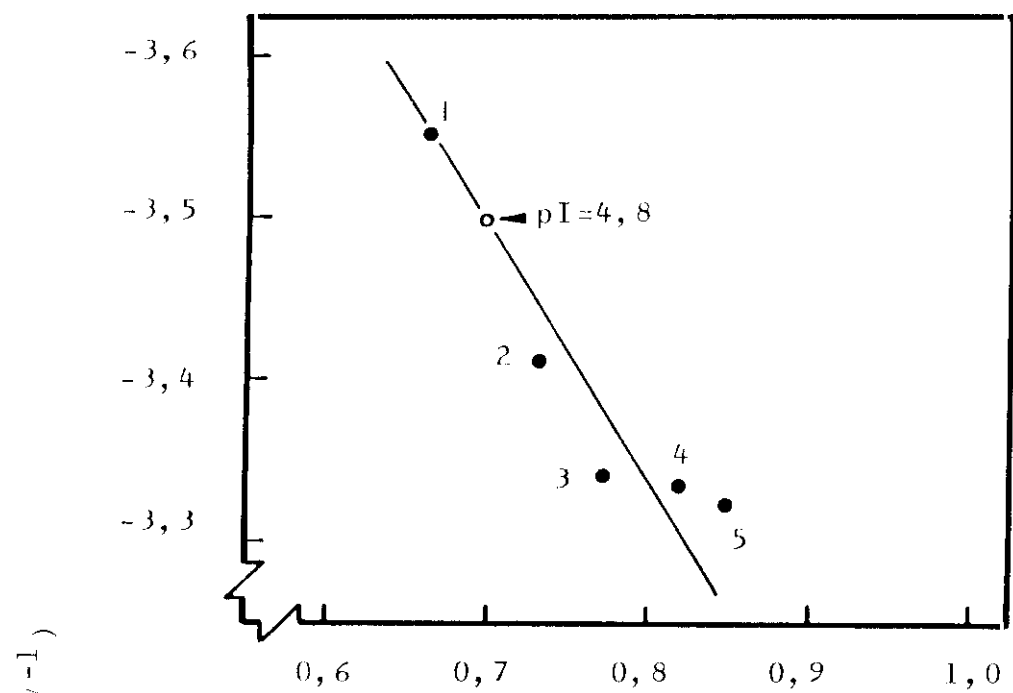


Tabla X.- Composición de aminoácidos de la isoforma IV de arginasa.

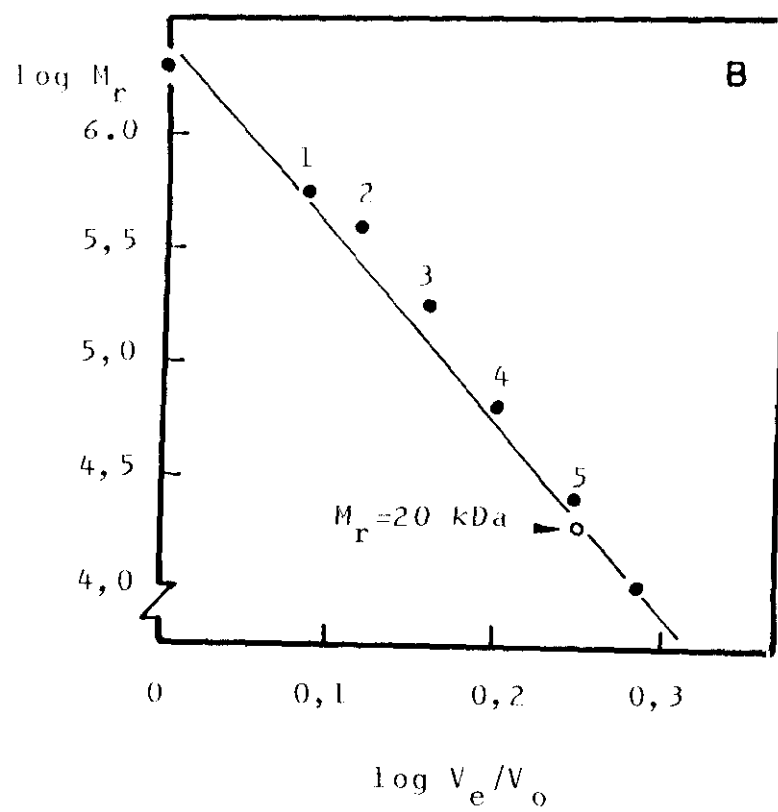
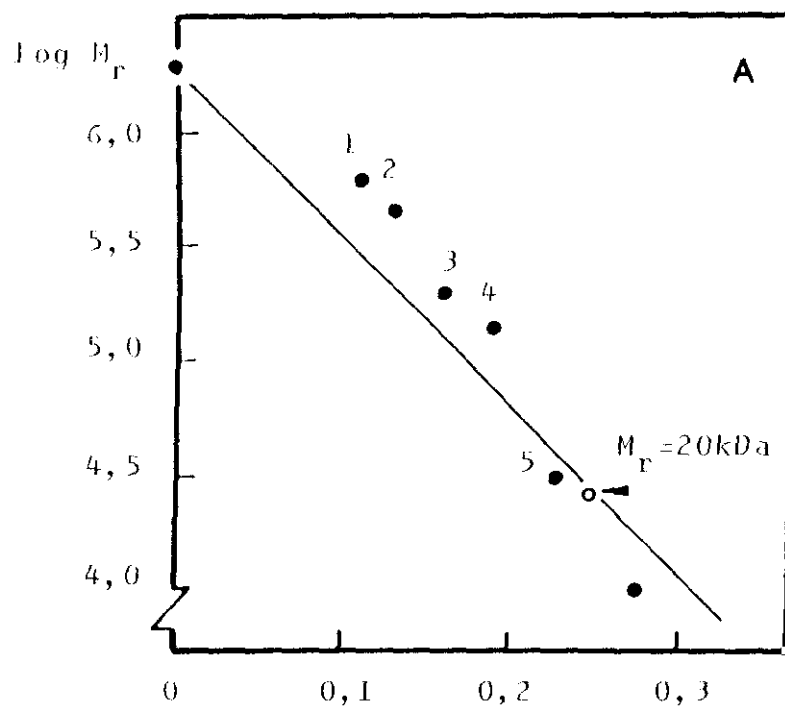
| Aminoácidos | % moles | Residuos* |
|-------------|---------|-----------|
| CYS** | 0,8 | 1 |
| ASX | 11,6 | 18 |
| THR | 6,0 | 9 |
| SER | 9,8 | 15 |
| GLX | 14,9 | 23 |
| PRO | 4,8 | 7 |
| GLY | 15,4 | 24 |
| ALA | 8,4 | 13 |
| VAL | 5,6 | 9 |
| MET | 1,0 | 1 |
| ILE | 3,2 | 5 |
| LEU | 5,6 | 9 |
| TYR | 1,8 | 3 |
| PHE | 2,3 | 3 |
| HIS | 1,4 | 2 |
| LYS | 4,6 | 7 |
| ARG | 2,4 | 4 |
| TRP*** | | 2 |

* El número de residuos se expresa como el valor entero más próximo, asumiendo un peso molecular de 18.000 Da.

** Determinado como ácido cystéico.

*** Determinado espectrofotométricamente por el método de Beaven-Holiday.

Figura 24.- Rectas de calibrado para la determinación del peso molecular en función del volumen de elución relativo, construidas con proteínas de M_r conocida. La separación de proteínas se obtuvo mediante HPLC de exclusión molecular, según las condiciones de análisis descritas en el apartado II.8 de Material y Métodos. En (A), columna TSK G5000 PWXL; $y = 6,49 - 8,65x$; $r = 0,98$. En (B), dos columnas Zorbax-diol GF450-GF250, conectadas en serie; $y = 6,43 - 8,74x$; $r = 0,98$. 1 = tiroglobulina ($M_r = 660$ kDa); 2 = apoferritina ($M_r = 440$ kDa); 3 = β -amilasa ($M_r = 200$ kDa); 4 = albúmina de huevo ($M_r = 67$ kDa); 5 = anhidrasa carbónica ($M_r = 29$ kDa); 6 = citocromo c ($M_r = 12,4$ kDa). Las flechas indican la posición de la isoforma IV (O) de arginasa en las rectas de calibrado.



III.2.- CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LAS ISOFORMAS I, III Y IV DE ARGINASA

En este bloque se presentan las Figuras 25 a 29

III.2.1.- Espectros de absorción ultravioleta

Los espectros de absorción de las isoformas I, III y IV de arginasa en el rango de longitudes de onda del ultravioleta (190-340 nm) se muestran en la Figura 25. En ellos se puede observar un máximo centrado a 275-278 nm para las tres isoformas. Este máximo de absorción se encuentra ligeramente desplazado hacia longitudes de onda inferiores al valor que posee el máximo en el espectro de absorción del Trp libre. Ello indica la existencia de Tyr (ver Tablas V, VII y X), cuya absorción máxima se encuentra a 277 nm.

Otro aspecto a destacar es la existencia de una discreta absorción a partir de los 310 nm, hecho que podría reflejar una cierta tendencia a la agregación de las proteínas.

III.2.2.- Espectros de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia de las isoformas I, III y IV de arginasa, excitando a diferentes longitudes de onda se muestran en las Figuras 26, 27 y 28.

Cuando la longitud de onda de excitación es de 275 nm (Fig. 26), es decir, excitando simultáneamente Tyr y Trp, los espectros de emisión de las tres isoformas de arginasa presentan dos máximos, uno centrado a 342-346 nm y otro a 305 nm. Debe destacarse la emisión a 288-290 nm que presenta la isoforma III de arginasa.

Cuando la muestra se excita con luz de longitud de onda de 295 nm (Fig. 27), es decir, analizando exclusivamente la contribución de Trp, se detecta un máximo de emisión a 351 nm y un hombro a 416 nm en la isoforma I. Las isoformas III y IV también emiten fluorescencia a 351 nm, pero su máximo principal se encuentra a 331 nm; se puede también observar otro máximo secundario a 397-401 nm.

Al analizar la contribución de la Phe al espectro de emisión de fluorescencia, excitando a 257 nm (Fig. 28), se observa que las tres isoformas de arginasa presentan un máximo de emisión en el entorno de 345-350 nm. Las isoformas I y IV poseen otro máximo secundario de emisión a 290-300 nm, pero la isoforma III no lo posee.

En la Figura 29 se recoge el espectro de emisión y excitación simultáneas (espectro sincrónico o "sincroscan") de las isoformas I, III y IV. Las tres presentan un máximo de emisión principal alrededor de los 355-356 nm y un máximo de emisión secundario en la zona de los 305-307 nm, que la isoforma III no posee.

Figura 25.- Espectros de absorción ultravioleta de: 42 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma I (\blacktriangle); 37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma III (\blacksquare) y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma IV (\bullet) de arginasa, disueltas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (isoformas I y IV) o pH 6,5 (isoforma III).

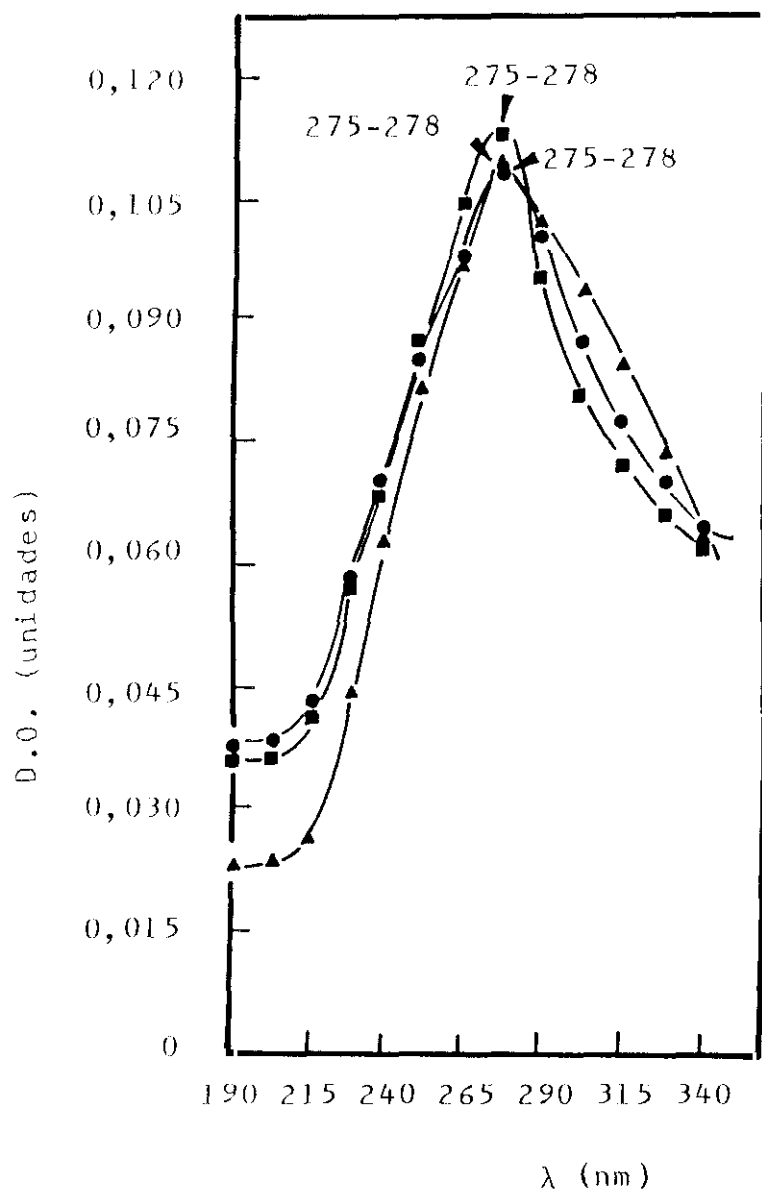


Figura 26.- Espectro de emisión de fluorescencia de: 42 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de isoforma I (●); 37 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de isoforma III (■) y 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de isoforma IV (▲) de arginasa, disueltas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (isoformas I y IV) o pH 6,5 (isoforma III). Longitud de onda de excitación 275 nm.

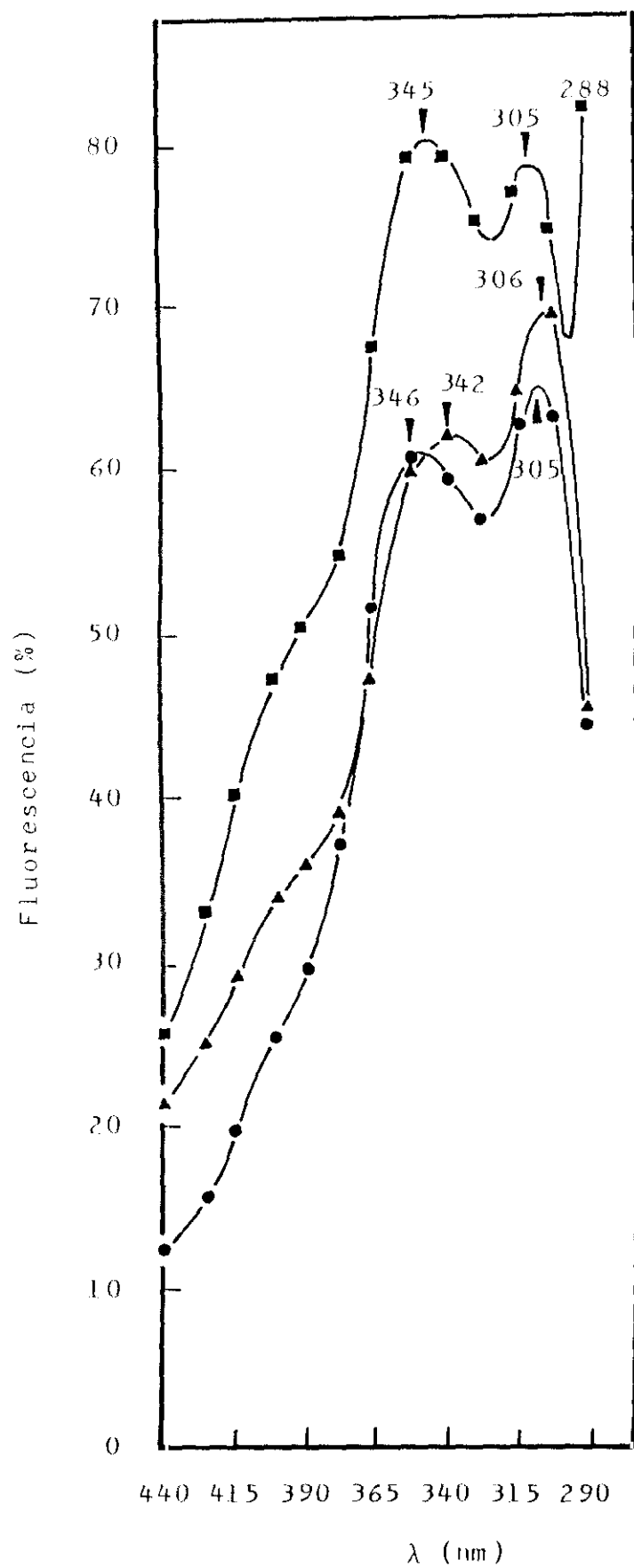


Figura 27.- Espectro de emisión de fluorescencia de: 42 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma I (●); 37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma III (■) y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma IV (▲) de arginasa, disueltas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (isoformas I y IV) o pH 6,5 (isoforma III). Longitud de onda de excitación 295 nm.

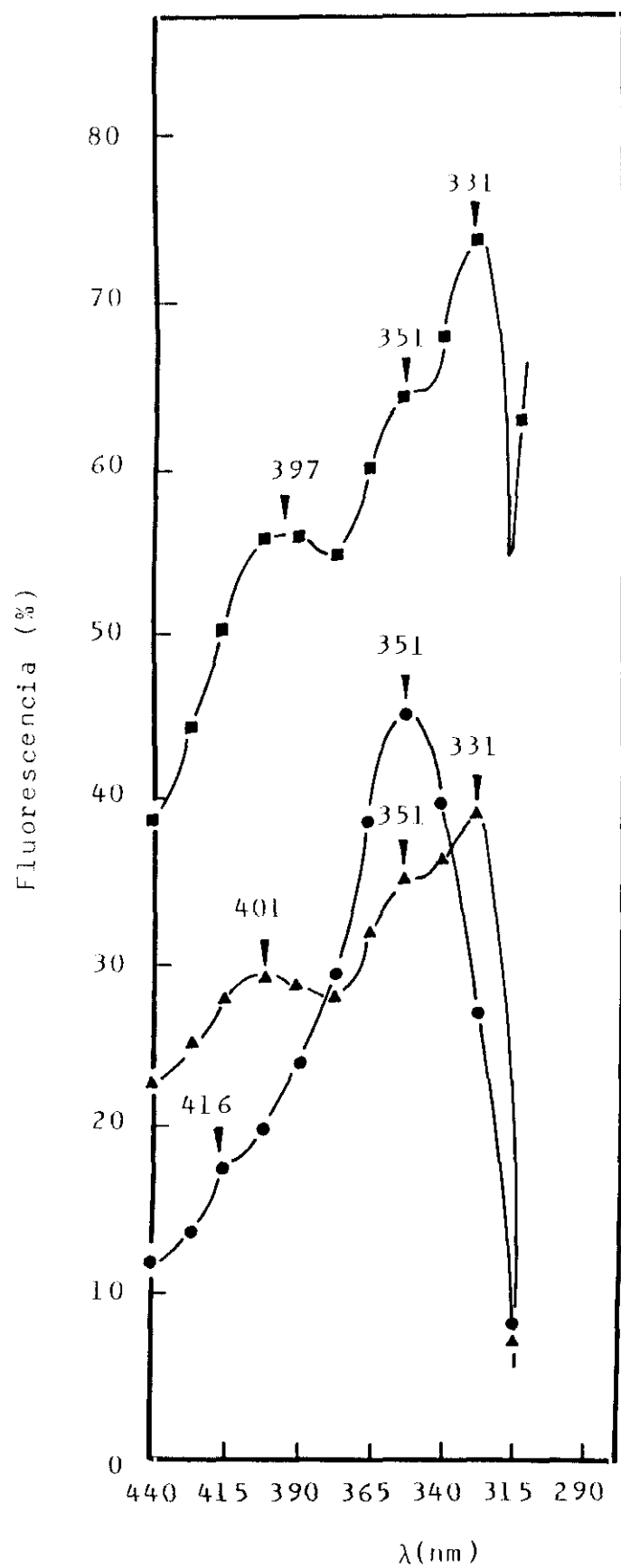


Figura 28.- Espectro de emisión de fluorescencia de: 42 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma I (●); 37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma III (■) y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de isoforma IV (▲) de arginasa, disueltas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (isoformas I y IV) o pH 6,5 (isoforma III). Longitud de onda de excitación 257 nm.

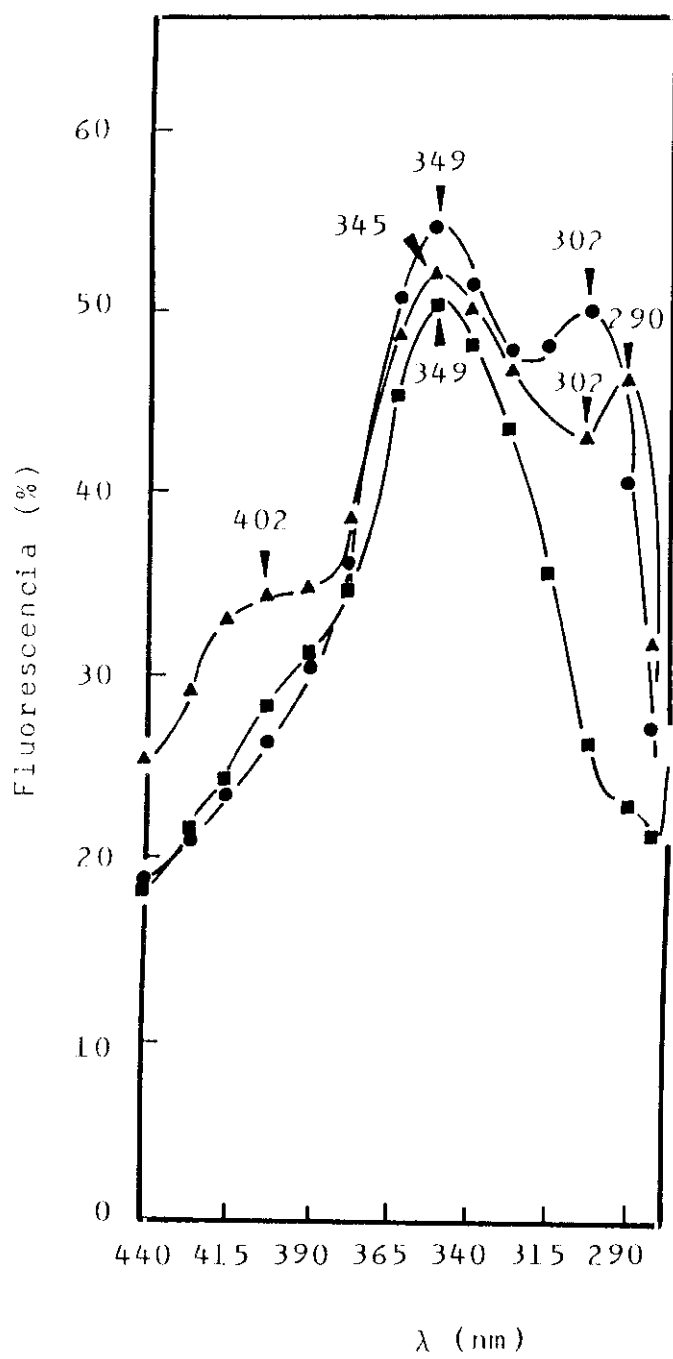
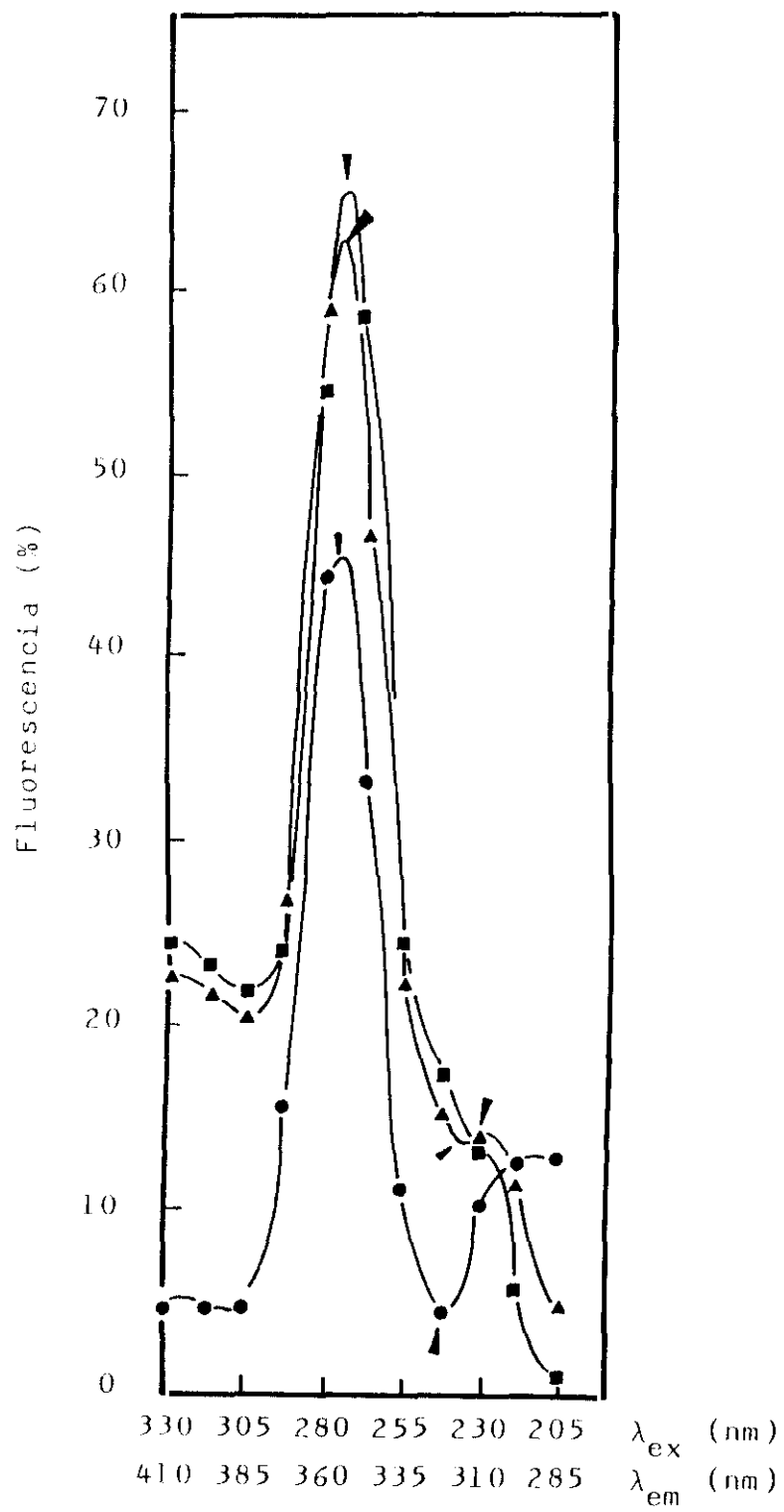


Figura 29.- Espectros de emisión y excitación simultáneos de fluorescencia de las isoformas I (●), III (■) y IV (▲) de arginasa disueltas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 (isoformas I y IV) o pH 6,5 (isoforma III).



III.3.- ANALISIS Y CUANTIFICACION DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO

En este bloque se presentan las Figuras 30 a 36 y las Tablas XI y XII

III.3.1.- Espectros de absorción ultravioleta

Los espectros de absorción de los fenoles atranorina y ácidos evérnico y úsnico, en el rango de longitudes de onda del ultravioleta (210-350 nm), se recogen en las Figuras 30 A-C.

En todos ellos se observa un máximo alrededor de 270-280 nm, que se corresponde con el máximo de absorción de los compuestos aromáticos. La atranorina (Fig. 30 A) presenta un máximo a los 280 nm; el ácido evérnico (Fig 30 B) absorbe a los 270 nm, mientras que el ácido úsnico (Fig. 30 C) presenta el máximo a 280 nm.

A la vista de estos resultados se eligieron las longitudes de onda de máxima absorción de cada fenol en los análisis de HPLC.

III.3.2.- Estabilidad en disoluciones tamponadas

La estabilidad de una disolución de atranorina ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 y pH 6,5, se muestra en las Figuras 31 A y B, respectivamente. La atranorina, a la citada concentración, tarda en disolverse por completo 48 h, independientemente del pH. Entre las 48 h y las 120 h, la cantidad de atranorina que se detecta es la misma, lo cual indica que no se está degradando o convirtiendo en otros productos.

La estabilidad de una disolución de ácido evérnico ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1 y 6,5, se muestra en las Figuras 32 A y B, respectivamente.

Cuando el pH de la disolución es 9,1 (Fig. 32 A), la cantidad de ácido evérnico, registrada como cuentas de área, desciende rápidamente durante las 24 primeras horas hasta alcanzar un tercio de la cantidad inicial. A este tiempo se detectan ácidos orselínico y evernínico, productos de degradación del ácido evérnico. La cantidad de ácido orselínico desciende a partir de las 72 h, momento en el cual se empieza a detectar orcinol, producto de degradación del ácido orselínico. El ácido evernínico no se degrada, al menos hasta las 120 h de análisis.

Cuando la disolución se hace a pH 6,5 (Fig. 32 B), la estabilidad del ácido evérnico es mayor. Los ácidos orselínico y evernínico también se detectan a partir de las 6 primeras horas

pero en menor cantidad que a pH 9,1. El ácido evérnico se degrada a partir de las 24 h, pero no aparece orcinol en cantidad detectable, al menos durante las 120 h de análisis.

En las Figuras 33 A y B se muestra la estabilidad del ácido úsnico ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en disoluciones tamponadas con Tris-HCl 0,1 M a pH 9,1 (Fig. 33 A) y pH 6,5 (Fig. 33 B). La máxima solubilidad del ácido úsnico se alcanza a tiempos mayores (48 h) a pH 6,5 que a pH 9,1 (24 h). A partir de entonces, el ácido úsnico no parece degradarse y es estable, como lo demuestra el hecho de no observar ni aparición de productos de degradación ni variación en su cantidad.

III.3.3.- Separación y cuantificación mediante HPLC

Los fenoles extraídos del córtex, del talo y del medio de incubación, según lo descrito en el apartado II.10.1 de Material y Métodos, procedentes de talos incubados en L-arginina 40 mM durante diferentes tiempos en oscuridad, fueron analizados por HPLC. La separación se realizó en fase reversa, empleando una columna Nucleosil 5C8, en las condiciones de análisis descritas en el apartado II.10.4.

Las Figuras 34 A-C muestran cromatogramas significativos. El análisis dura 6 min, ya que a este tiempo ha eluido el ácido úsnico (cuando está presente), último fenol en aparecer debido a la menor polaridad que presenta en comparación con la atranorina y los ácidos orselínico, evernínico y evérnico. La proporción de cada pico varía en relación a la procedencia de la muestra.

La cuantificación de la atranorina y los ácidos evérnico y úsnico se realizó mediante interpolación de los valores de cuentas de área obtenidos en una recta de calibrado construida con concentraciones crecientes de cada patrón. Se eligió el rango de linealidad del detector en todos los casos. Las rectas de calibrado que representan cuentas de área en función de la concentración fueron ajustadas por mínimos cuadrados y utilizadas en la cuantificación de los fenoles. Estas rectas de calibrado se muestran en la Tabla XI.

III.3.4.- Valoración del contenido de fenoles en muestras de córtex, talo y medio de incubación

Con objeto de relacionar el contenido de fenoles y la máxima actividad de cada isoforma de arginasa, se estudió la variación temporal de atranorina y ácidos evérnico y úsnico en función de las condiciones de incubación. El análisis se realizó a tres niveles: valorando los fenoles presentes en el córtex, en el talo (una vez eliminados los corticales) y los disueltos en los medios de incubación, según lo descrito en los apartados II.10.1.1 y II.10.1.2.

En la Figura 35 se muestran los resultados de la variación temporal de fenoles en muestras de talo incubadas en L-arginina 40 mM tamponadas con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1. El ácido evérnico y la atranorina representan el 70% y el 30%, respectivamente, de los fenoles totales extraídos del córtex en ausencia de cualquier tratamiento. La cantidad de ácido úsnico aumenta progresivamente desde el comienzo de la incubación, mientras que el contenido de ácido evérnico disminuye en la misma medida en el córtex (Fig. 35 A-C).

En el talo (Figs. 35 D-F), la atranorina es, sin embargo, el fenol que se encuentra en mayor cantidad; el ácido evérnico aparece en trazas y de ácido úsnico se detectan valores alrededor de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de talo seco.

En el medio (Figs. 35 G-I) se disuelve principalmente el ácido evérnico, cuyo contenido alcanza aproximadamente los $12,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de talo seco entre las 4 h y 8 h de incubación. La atranorina sólo se detecta a tiempos cortos y el contenido en ácido úsnico aumenta progresivamente desde las 10 h de incubación de los talos.

Cuando éstos son incubados en disoluciones de cicloheximida $40 \text{ }\mu\text{M}$, en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, el patrón de distribución de los fenoles, en los diferentes extractos, es muy distinto al obtenido cuando hay L-arginina en el medio. Los resultados pueden observarse en las Figuras 36 A-I.

En el córtex (Figs. 36 A-C) se pueden detectar cantidades apreciables de atranorina y ácido úsnico que oscilan entre 8 y $30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de talo seco. El contenido de ácido evérnico es algo

mayor, alrededor de $40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de talo seco, excepto a las 2 h de incubación, cuando se detectan unos $140 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de talo seco.

La cantidad de fenoles (atranorina y ácido úsnico) detectada en talo (Figs. 36 E y F) en muestras incubadas en presencia del inhibidor de la traducción es semejante a la de aquellas incubadas en L-arginina. El contenido de ácido evérnico en el talo (Fig. 36 D) es, sin embargo, mayor y pueden apreciarse dos máximos a 4 y 10 h de incubación.

Atranorina y ácidos evérnico y úsnico se solubilizan en menor cantidad en el medio (Figs. 36 G-I) que en el caso anterior (Figs. 35 G-I) como puede apreciarse por la diferencia de escala gráfica.

El ácido úsnico es el fenol detectado en mayor cantidad en el medio de incubación. Su contenido oscila entre 0,1 y $0,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de talo seco.

III.3.5.- Valoración del contenido de fenoles solubles en el extracto libre de células

La solubilidad de los fenoles en disoluciones acuosas es muy baja aunque, como se ha señalado, varía en función del pH (Figs. 31, 32 y 33). Como una primera aproximación, se calculó la cantidad de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico que se solubiliza en los extractos libres de células procedentes de muestras de talo a los tiempos en que se detecta la máxima actividad de cada isoforma de arginasa. Estos son:

- i) Máxima actividad de la isoforma I de arginasa: talo incubado 6 h en L-arginina 40 mM tamponada con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1.
- ii) Máxima actividad de la isoforma III de arginasa: talo incubado 16 h en cicloheximida 40 μM tamponada con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1.
- iii) Máxima actividad de la isoforma IV de arginasa: medio de incubación procedente de talos incubados 8 h en L-arginina 40 mM tamponada con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1.

La cantidad de cada fenol detectada en estas condiciones puede ser un indicativo de la concentración accesible a la proteína y, en principio, aquella capaz de ejercer un determinado

efecto fisiológico. La extracción se realizó según lo descrito en el apartado II.10.1.3. de Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XII. En las condiciones de máxima actividad de la isoforma I de arginasa (i) se detectan 0,19 nmol de atranorina, 0,75 nmol de ácido evérnico y 1,0 nmol de ácido úsnico. Estas cantidades son mayores en las condiciones de máxima actividad de la isoforma III de arginasa (ii), ya que se detectan 1,1 nmol de atranorina, 2,3 nmol de ácido evérnico y 2,7 nmol de ácido úsnico. En las condiciones de máxima actividad de la isoforma IV de arginasa (iii), el extracto libre de células contiene 5,4 nmol de atranorina, 3,7 nmol de ácido evérnico y 4,0 nmol de ácido úsnico. Todos los valores vienen expresados por g de peso de talo seco.

En este punto conviene puntualizar que los fenoles liquénicos están localizados en tres posiciones específicas:

a) Fenoles corticales, exocelulares, cristalizados sobre las hifas que forman el córtex, en donde actúan a modo de pantalla para filtrar densidades de flujo fotónico no lesivas para las algas.

b) Fenoles intratalinos que, a su vez, pueden estar cristalizados sobre las paredes celulares, tanto del fotobionte como del micobionte, o pueden estar localizados en el interior celular, solubilizados en el citosol, tanto de las algas como del hongo. Sólo en esta última localización podrá tener efecto fisiológico sobre las enzimas citosólicas.

La estimación de la concentración de fenoles en los extractos libres de células puede dar una idea aproximada de la concentración de fenoles intracelulares, aunque no exacta, dado que parte de los fenoles parietales pueden disolverse durante el proceso de preparación. Por ello, se ha estimado la concentración de fenoles corticales (apartado II.10.1 de Material y Métodos) y fenoles intracelulares por comparación a la encontrada en los extractos libres de células. La concentración de fenoles en córtex resultó ser aproximadamente 47 veces superior, y la de medulares 1,9 veces inferior a la del extracto libre de células. Por ello, para estimar la acción de los diferentes efectores sobre la hipotética cooperatividad de una isoforma con el sustrato, se han utilizado concentraciones de fenol aproximadamente mitad de las encontradas en los extractos

libres de células para las isoformas I y III , talinas, y prácticamente igual a la encontrada en los medios de cultivo para la isoforma IV, segregable, según se especifica en las Tablas I y XII.

Figura 30.- Espectros de absorción ultravioleta de atranorina (A), ácido evérnico (B) y ácido úsnico (C) preparados en agua-HPLC:ácido acético (99:1,v/v) /acetonitrilo (30/70,v/v). La concentración empleada fue de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.
D.O. = densidad óptica.

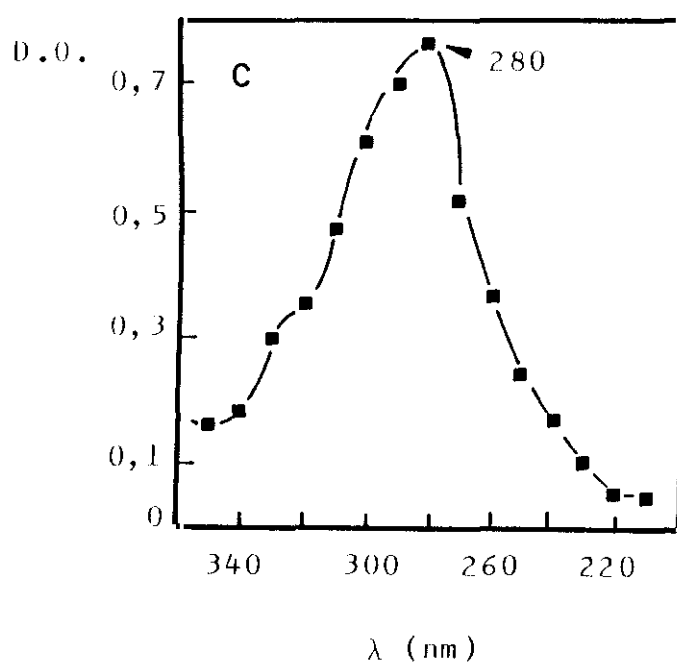
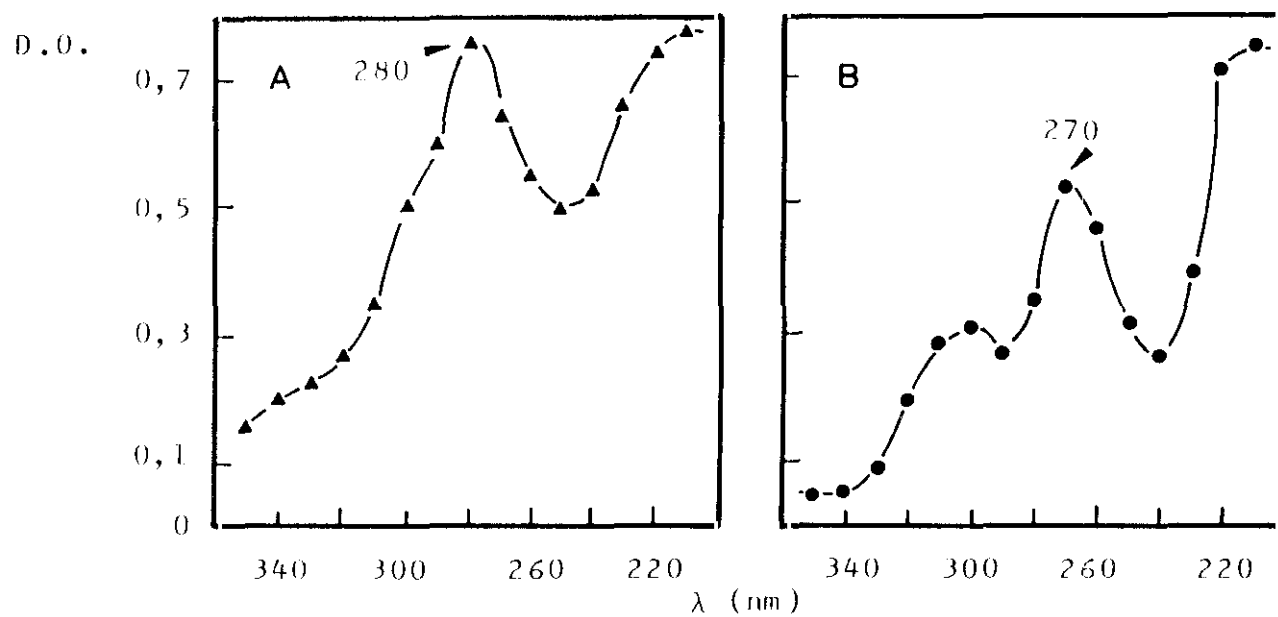
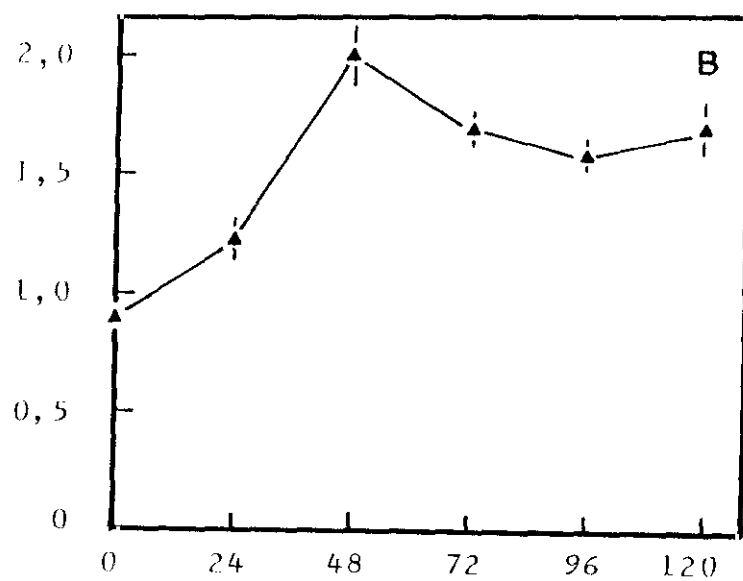
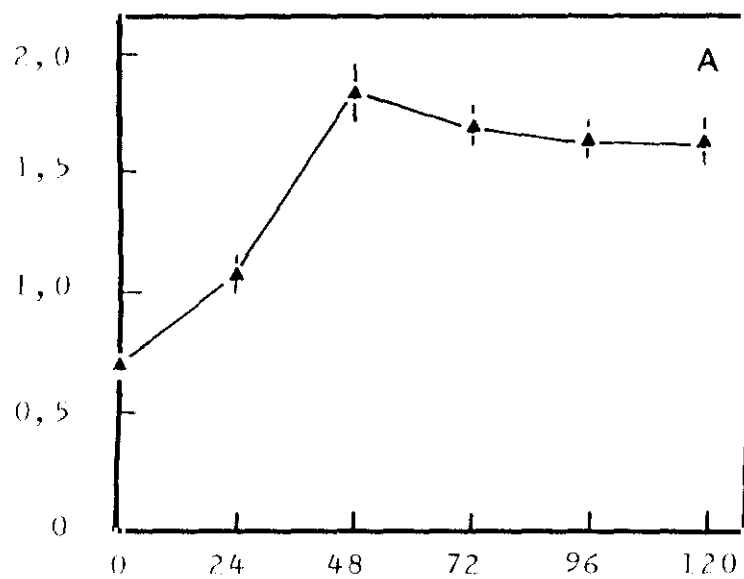


Figura 31. - Estabilidad de una disolución de atranorina ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en tampón Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ a pH 9,1 (A) y pH 6,5 (B) en función del tiempo en oscuridad. La cuantificación de atranorina se llevó a cabo mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa Nucleosil 5C8 en las condiciones de análisis especificadas en el apartado II.10.4 de Material y Métodos.

Cuentas de área ($\times 10^6$)



Tiempo (h)

Figura 32.- Estabilidad de una disolución de ácido evérnico ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (●) en tampón Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ a pH 9,1 (A) y pH 6,5 (B) en función del tiempo en oscuridad. La cuantificación de atranorina se llevó a cabo mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa Nucleosil 5C8 en las condiciones de análisis especificadas en el apartado II.10.4 de Material y Métodos. (○), ácido evernínico; (◐), ácido orselínico; (+), orcinol.

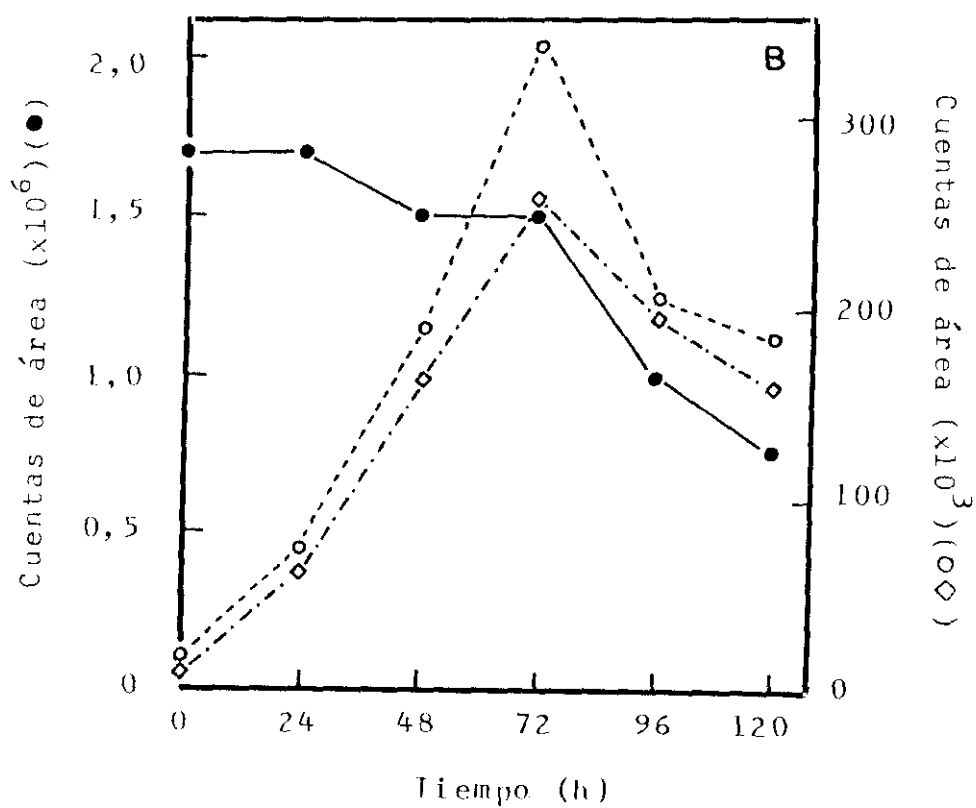
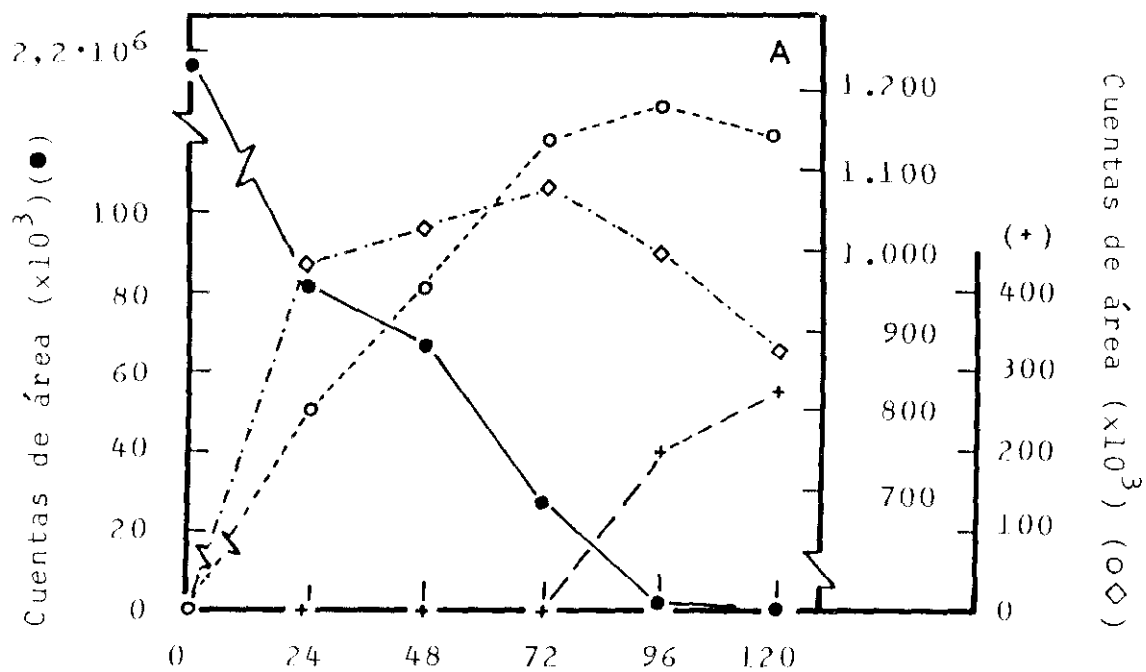
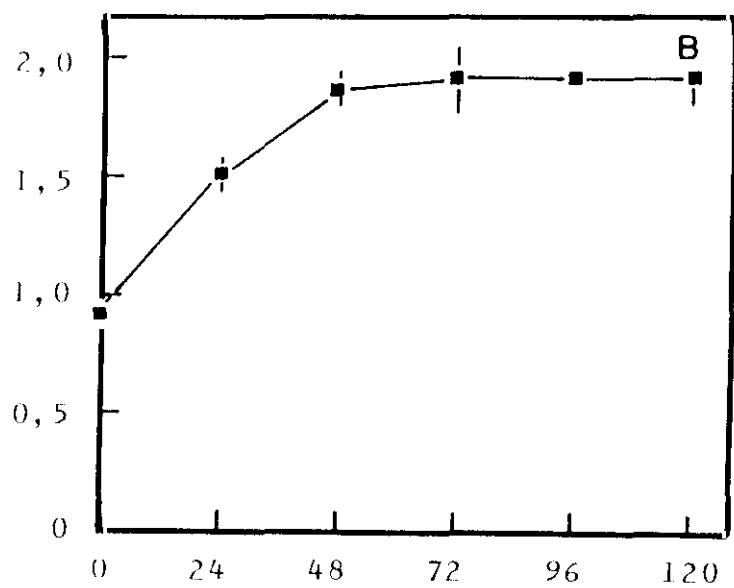
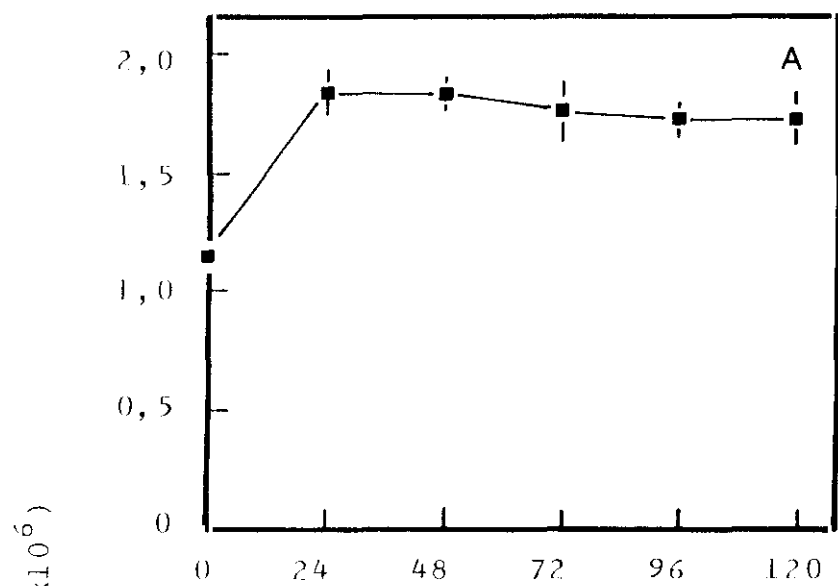
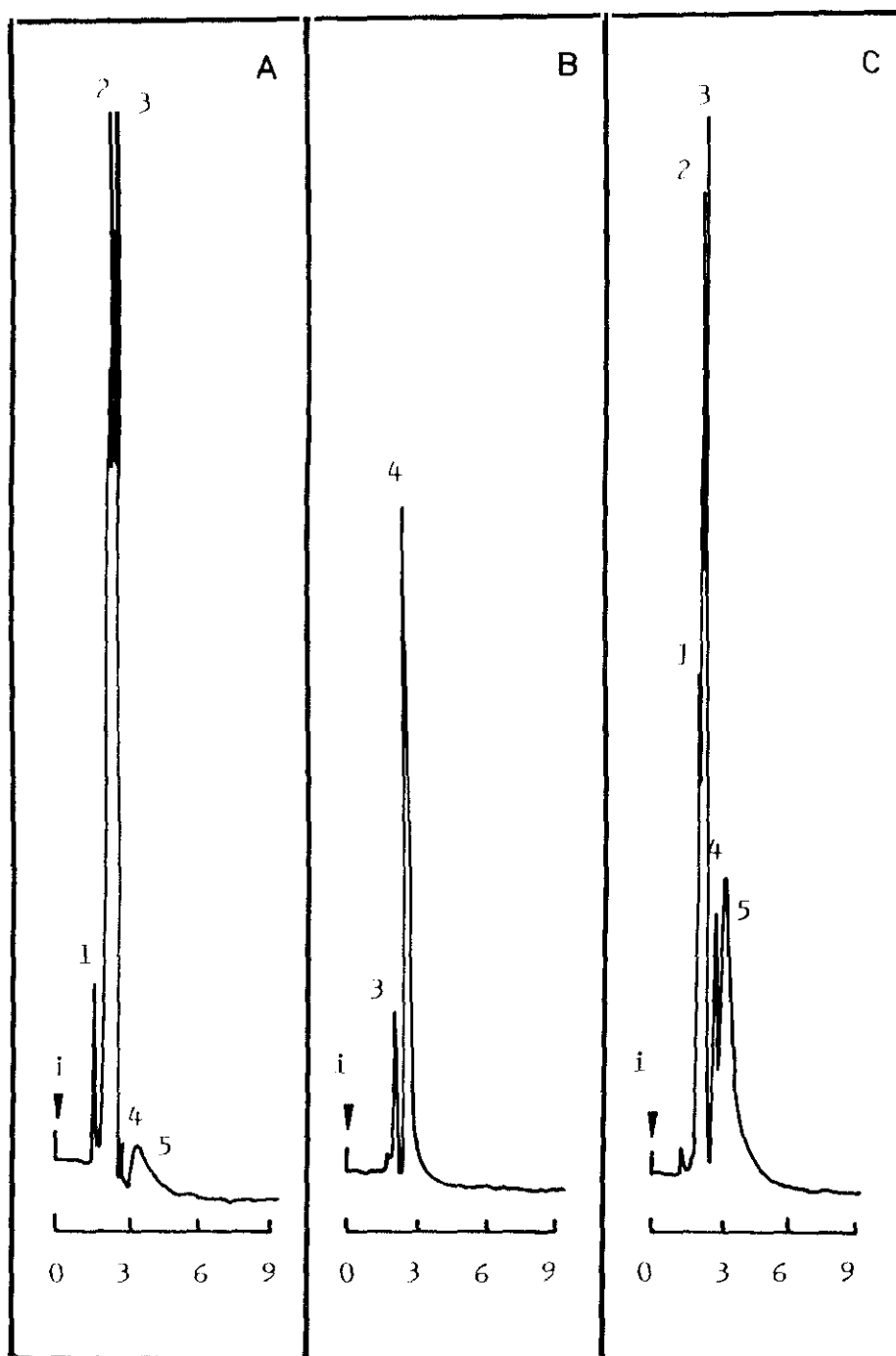


Figura 33.- Estabilidad de una disolución de ácido úsnico ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en tampón Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ a pH 9,1 (A) y pH 6,5 (B) en función del tiempo en oscuridad. La cuantificación de ácido úsnico se llevó a cabo mediante HPLC utilizando una columna de fase reversa Nucleosil 5C8 en las condiciones de análisis especificadas en el apartado II.10.4 de Material y Métodos.



Tiempo (h)

Figura 34.- Cromatogramas representativos de los fenoles de *E. prunastri* obtenido a partir de diferentes muestras, según lo descrito en el apartado II.10.1 de Material y Métodos. En (A) , córtex obtenido de talos incubados 16 h en L-arginina 40 mM; en (B), talo incubado 2 h en L-arginina 40 mM; en (C), medio obtenido de talos incubados 6 h en L-arginina 40mM. La separación se realizó en HPLC utilizando una columna Nucleosil 5C8 de fase reversa en las condiciones de análisis descritas en el apartado II.10.4 de Material y Métodos. 1, ácido orselínico; 2, ácido evernínico; 3, ácido evérnico; 4, atranorina; 5, ácido úsnico. i = inyección.



Tiempo (min)

Tabla XI.- Ecuaciones de las rectas de calibrado, ajustadas por mínimos cuadrados, empleadas en la cuantificación de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico, separados mediante HPLC en una columna Nucleosil 5C8 de fase reversa en las condiciones descritas en el apartado II.10.4. de Material y Métodos.

| Fenol | Ecuación de la recta de calibración indirecta* |
|--|--|
| Atranorina (con ácido evérnico 0,01 mg·ml ⁻¹ como patrón externo) | $y = - 0,039 + 0,55 x; r = 0,99$ |
| Acido evérnico (con atranorina 0,02 mg·ml ⁻¹ como patrón externo) | $y = - 0,196 + 3,66 x; r = 0,98$ |
| Acido úsnico (con ácido evérnico 0,01 mg·ml ⁻¹ como patrón externo) | $y = - 0,377 + 2,34 x; r = 0,97$ |

* Calibración referida al patrón externo

Figura 35.- Variación de la cantidad de ácido evérnico (●), atranorina (▲) y ácido úsnico (■) en función del tiempo de incubación de talos de *F. prunastri*, en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, conteniendo L-arginina 40 mM. En (A,B y C), fenoles del córtex; en (D,E y F), fenoles de talo una vez extraídos los del córtex y en (G,H e I), fenoles en el medio de incubación.

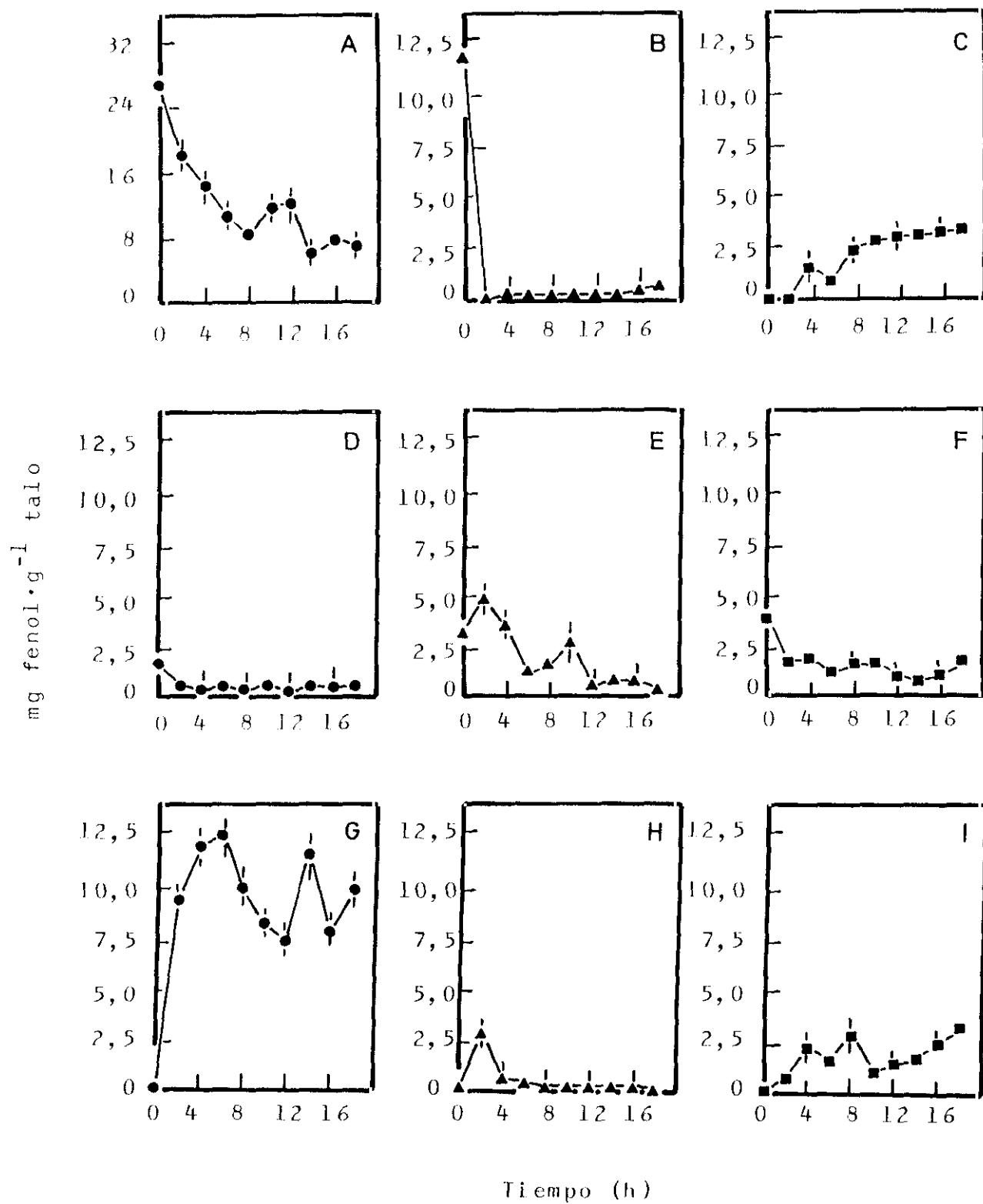


Figura 36.- Variación de la cantidad de ácido evérnico (●), atranorina (▲) y ácido úsnico (■) en función del tiempo de incubación de talos de *E. prunastri*, en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,1, conteniendo cicloheximida 40 μ M. En (A,B y C), fenoles del córtex; en (D,E y F), fenoles de talo una vez extraídos los del córtex y en (G,H e I), fenoles en el medio de incubación.

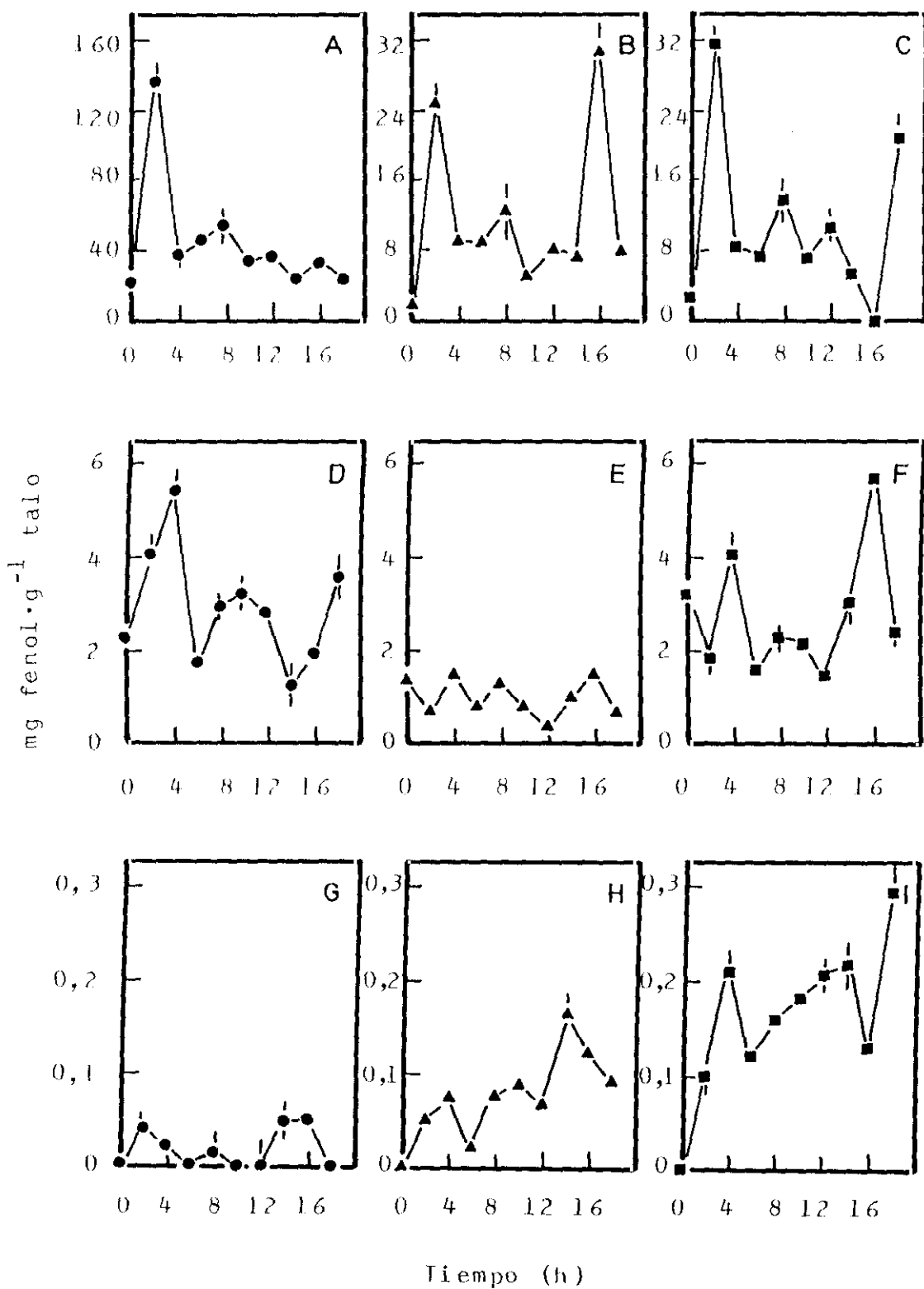


Tabla XII.- Cantidad de fenoles endógenos detectada en los extractos libres de células (medio de incubación) de talos de *E. prunastri* incubados en las condiciones de máxima actividad de cada isoforma de arginasa.

| Isoforma de arginasa | Condiciones de máxima actividad* | Fenol (nmol·g ⁻¹ peso seco) | | |
|----------------------|----------------------------------|---|----------------|--------------|
| | | atranorina | ácido evérnico | ácido úsnico |
| I | 6 h en L-arginina 40 mM | 0,19 ± 0,020 | 0,75 ± 0,008 | 1,00 ± 0,030 |
| III | 16 h en cicloheximida 40 µM | 1,10 ± 0,015 | 2,26 ± 0,007 | 2,72 ± 0,020 |
| IV | 8 h en L-arginina 40 mM | 5,37 ± 0,012 | 3,67 ± 0,008 | 4,05 ± 0,030 |

* Detalles en apartado II.10.1.3 de Material y Métodos

III.4.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE EFECTORES

En este bloque se presentan las Figuras 37 a 44 y la Tabla XIII

La caracterización cinética de una enzima incluye habitualmente la determinación de su velocidad máxima (v_{\max}) de reacción y de su constante de Michaelis-Menten (K_m) para cada sustrato. Estos datos resultan muy útiles a la hora de comparar diferentes isoformas. Por otro lado, la presencia de uno o varios efectores puede modificar la cinética de la enzima, pudiéndose comportar éstos como activadores o inhibidores. Los cambios producidos por el efector se pueden observar a nivel de v_{\max} y K_m , encontrándose diferente tipo de acción sobre cada isoforma.

Ya que existen variaciones del contenido de fenoles en las condiciones de máxima actividad de cada isoforma particular, se trató de ligar estos dos hechos estudiando el comportamiento cinético de cada isoforma en presencia y/o ausencia de efector.

III.4.1.- Sobre la isoforma I de arginasa

La estimación de velocidad de reacción de la isoforma I frente a concentraciones crecientes de sustrato (L-arginina) se realizó según lo descrito en los apartados II.11. y II.12. En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos.

La variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato se puede asimilar a una hipérbola, lo cual demuestra que la isoforma I es una enzima micaliana. A partir de concentraciones de L-arginina superiores a 6 mM se puede apreciar una ligera inhibición por exceso de sustrato. El valor de K_m , estimado a partir de esta representación directa, es de 1,5 mM y el de v_{\max} de 2,49 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

La representación directa de los datos, concentración de sustrato frente a velocidad de reacción, es el mejor sistema para calcular K_m y v_{\max} , ya que no es necesario hacer transformaciones de los resultados experimentales que distorsionan los posibles errores cometidos en las medidas. Una variación de la representación directa de Michaelis-Menten es la sugerida por Eisenthal-Cornish-Bowden, donde K_m y v_{\max} vienen definidas como la media de las diferentes intersecciones obtenidas al representar las rectas formadas por los pares (v_0 , [S]). La manera de representar los datos es la siguiente: cada valor de velocidad se dibuja en el eje de ordenadas

(v_{\max}) y los correspondientes valores negativos de sustrato ($-[S]$) se dibujan en el eje de abscisas (K_m). Los dos puntos se unen extrapolando la línea en el espacio $v_{\max} \leftrightarrow K_m$. En la Figura 38 se muestra esta representación, obtenida a partir de los resultados de velocidad de reacción de la isoforma I de arginasa. Los valores de K_m y v_{\max} que se obtienen son 4,9 mM y 5,25 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente.

La representación de dobles recíprocas de Lineweaver-Burk es la más utilizada, sin embargo, produce importantes desviaciones de los valores de K_m y v_{\max} , ya que los posibles errores cometidos en las medidas afectan en mayor grado a las dobles inversas de velocidad y concentración de sustrato.

La tercera representación elegida para el cálculo de los valores de K_m y v_{\max} fue la de Hanes, una transformación de los datos directos en la que se eligen los pares $[S] \cdot v_0^{-1}/[S]$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39. El valor de K_m obtenido fue de 1,25 mM y el de v_{\max} de 2,79 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

El efecto de la atranorina y los ácidos evérnico y úsnico sobre la velocidad de reacción de la isoforma I de arginasa se muestran en las Figuras 37 A-C (representación directa) y 39 A-C (representación de Hanes). La concentración fija de cada efector, utilizada en este estudio, es la que se detalla en la Tabla I de Material y Métodos (apartado II.12).

La atranorina 33,3 nM (Figs. 37 A y 39 A) se comporta como un activador no competitivo. Los valores de K_m y v_{\max} de la isoforma I varían en presencia del efector y, según la representación de Hanes (Fig. 39 A), los valores estimados son: $K_m(\text{ap}) = 1,1 \text{ mM}$ y $v_{\max}(\text{ap}) = 6,64 \mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

El ácido evérnico 130,0 nM (Figs. 37 B y 39 B) produce una pequeña activación y podría tratarse de un activador mixto. El valor de $K_m(\text{ap})$ de la isoforma I en presencia del efector es 0,68 mM según la representación de Hanes (Fig. 39 B); el valor de $v_{\max}(\text{ap})$ que se obtiene es de 2,75 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

A diferencia de la atranorina y el ácido evérnico, el ácido úsnico 173,3 nM (Figs. 37 C y 39 C) se comporta como un inhibidor competitivo de la isoforma I de arginasa. Los valores de

$K_m(ap)$ y $v_{max}(ap)$ en presencia del efector obtenidos a partir de la representación de Hanes (Fig. 39 C) son de 3,4 mM y 3,32 $\mu\text{moles de amonio}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente.

III.4.2.- Sobre la isoforma III de arginasa

La estimación de la velocidad de reacción de la isoforma III frente a concentraciones crecientes de sustrato (L-arginina) se realizó según lo descrito en los apartados II.11. y II.12. En la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos.

La variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato muestra una cinética sigmoideal, característica de enzimas alostéricas. A concentraciones de L-arginina superiores a 7 mM se aprecia una ligera inhibición por exceso de sustrato. El valor de $S_{0,5}$ ($\simeq K_m$), estimado a partir de esta representación directa, es de 4,5 mM y el de v_{max} de 2,12 $\mu\text{moles de amonio}\cdot\text{min}^{-1}$.

La representación de Hill (Fig.41) enfrentando $\log\left(\frac{v_0}{v_{max} - v_0}\right) / \log [S]$, normalmente utilizada en los análisis de cinéticas de tipo alostérico, da valores de pendiente de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados superiores a uno. Como se discutirá ampliamente, esta sería la primera prueba sobre existencia de cooperatividad positiva en el ligamiento del sustrato.

El efecto de la atranorina y los ácidos evérnico y úsnico sobre la velocidad de reacción de la isoforma III de arginasa se muestran en las Figuras 40 A-C (representación directa) y 41 A-C (representación de Hill). La concentración fija de cada efector, utilizada en este estudio, es la que se detalla en la Tabla I de Material y Métodos (apartado II.12). Los tres fenoles: atranorina 190 nM, ácido evérnico 390,0 nM y ácido úsnico 470 nM, se comportan como inhibidores, ya que la velocidad de reacción de la isoforma III de arginasa disminuye en su presencia. Los valores de $S_{0,5}(ap)$ son: 4,9 mM en presencia de atranorina; 4,4 mM en presencia de ácido evérnico y 4,5 mM en presencia de ácido úsnico (Tabla XIII).

III.4.3.- Sobre la isoforma IV de arginasa

La estimación de la velocidad de reacción de la isoforma IV frente a concentraciones crecientes de sustrato (L-arginina) se realizó según lo descrito en los apartados II.11. y II.12. En la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos.

La variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato se puede asimilar a una hipérbola, lo cual demuestra que la isoforma III es una enzima micaliana. En este caso, a diferencia de los anteriores (Figs. 37 y 40), no se aprecia inhibición por exceso de sustrato en el rango de concentraciones ensayadas. El valor de K_m , estimado a partir de esta representación directa, es de 4,45 mM y el de v_{max} de 3,0 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

En la Figura 43 se muestra la representación de Eísenthal-Cornish-Bowden obtenida a partir de los resultados de velocidad de reacción. Los valores de K_m y v_{max} que se obtienen son 4,0 mM y 4,7 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente. Los valores de K_m y v_{max} obtenidos mediante la representación de Hanes (Fig. 44) fueron: $K_m = 3,0 \text{ mM}$ y $v_{max} = 4,2 \mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

El efecto de la atranorina y los ácidos evérnico y úsnico sobre la velocidad de reacción de la isoforma IV de arginasa se muestran en las Figuras 42 A-C (representación directa) y 44 A-C (representación de Hanes). La concentración fija de cada efector, utilizada en este estudio, es la que se detalla en la Tabla I de Material y Métodos (apartado II.12).

La atranorina 1,69 mM se comporta como un activador mixto (Figs 42 A y 44 A). Los valores de K_m y v_{max} de la isoforma IV varían en presencia del efector y, según la representación de Hanes (Fig. 44 A), los valores estimados son $K_m(\text{ap}) = 0,96 \text{ mM}$ y $v_{max}(\text{ap}) = 3,95 \mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$.

El ácido evérnico 1,15 mM (Figs. 42 B y 44 B) y el ácido úsnico 1,27 mM (Figs. 42 C y 44 C) se comportan como inhibidores no competitivos de la isoforma IV. Los valores de $K_m(\text{ap})$ que se obtienen a partir de la representación de Hanes (Figs. 44 B y C) son 3,16 mM y 3,05 mM, respectivamente. Los valores de $v_{max}(\text{ap})$ de la misma representación son 3,69 y 3,39 $\mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente.

En la Tabla XIII se especifican los valores de K_m y v_{max} en ausencia y presencia de cada efector, obtenidas de cada una de las distintas representaciones gráficas.

Figura 37.- Efecto de la concentración de L-arginina (○) sobre la velocidad de reacción de la isoforma I de arginasa a una concentración de $13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En (A), en presencia de atranorina 33,3 nM (●); en (B), en presencia de ácido evérnico 130,0 nM (●) y en (C), en presencia de ácido úsnico 173,3 nM (●).

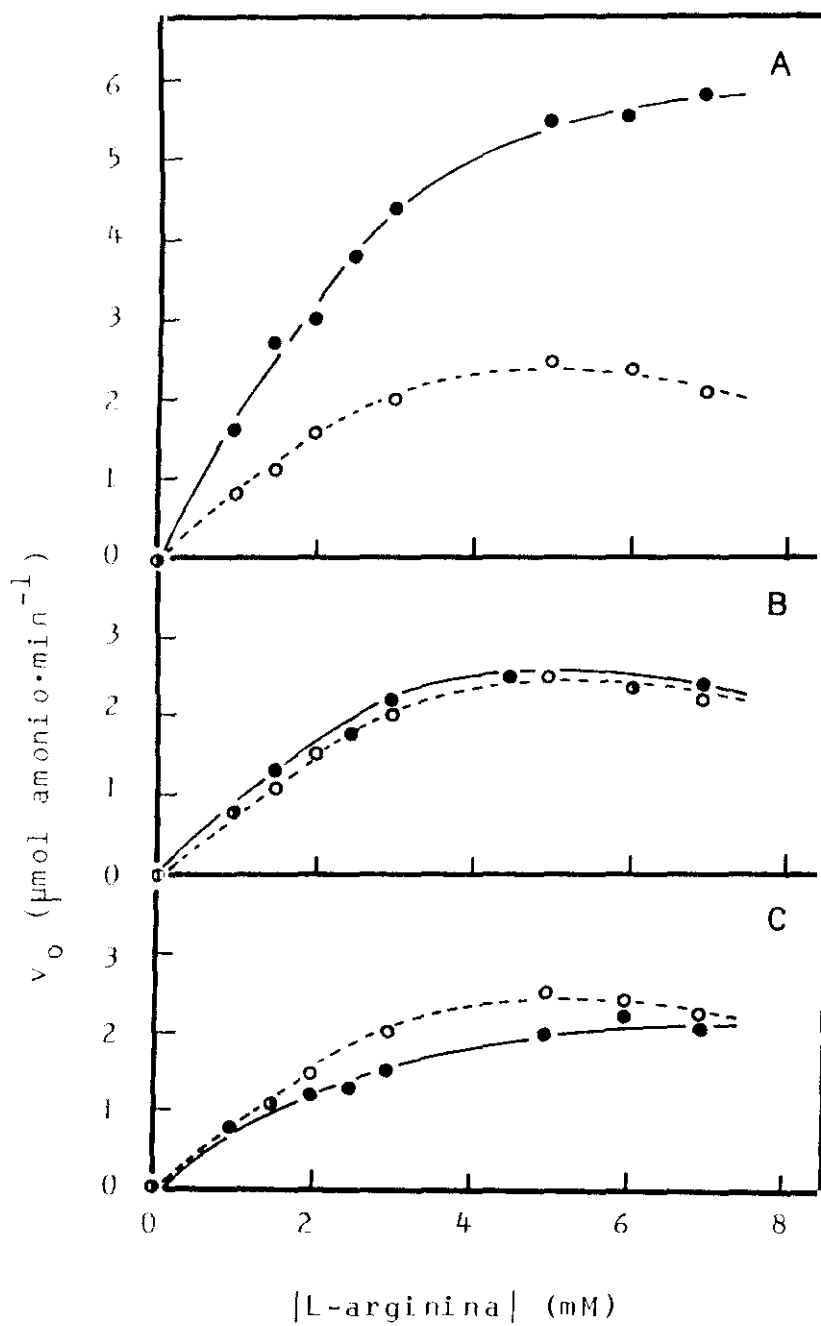


Figura 38.- Representación de Eisenthal-Cornish-Bowden para la determinación de K_m y v_{max} de la isoforma I de arginasa.

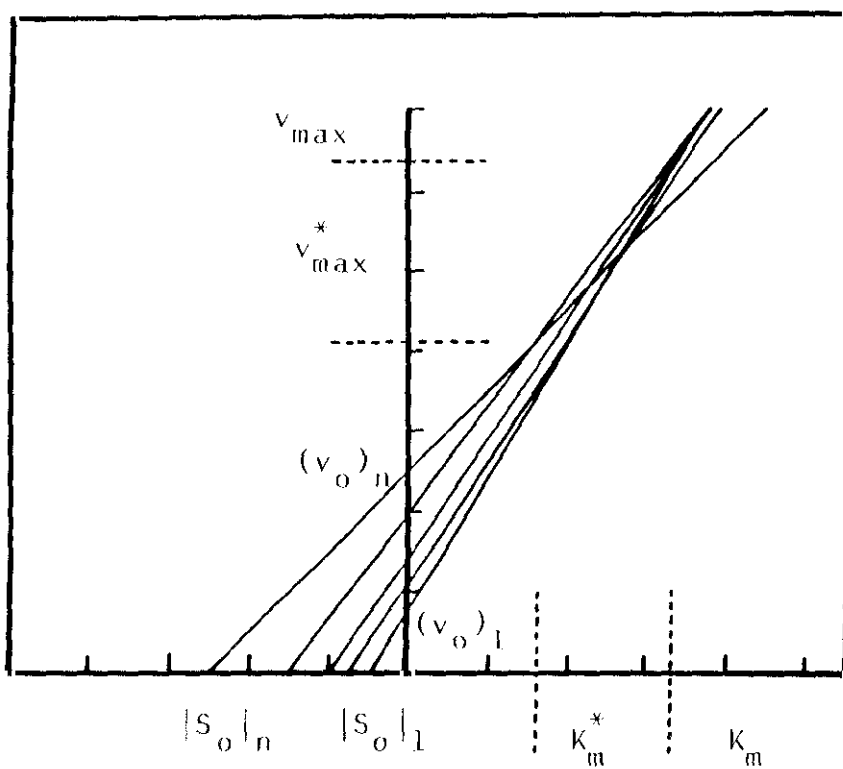


Figura 39.- Representación de Hanes sobre la variación de la velocidad de reacción de la isoforma I de arginasa ($13 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (○) en función de la concentración de L-arginina, $y = 0,45 + 0,36x$; $r = 0,97$. En (A), en presencia de atranorina 33,3 nM (●), $y = 0,17 + 0,15x$; $r = 0,99$; en (B), en presencia de ácido evérnico 130,0 nM (●), $y = 0,25 + 0,36x$; $r = 0,99$; y en (C), en presencia de ácido úsnico 173,3 nM (●), $y = 1,02 + 0,30x$; $r = 0,96$.

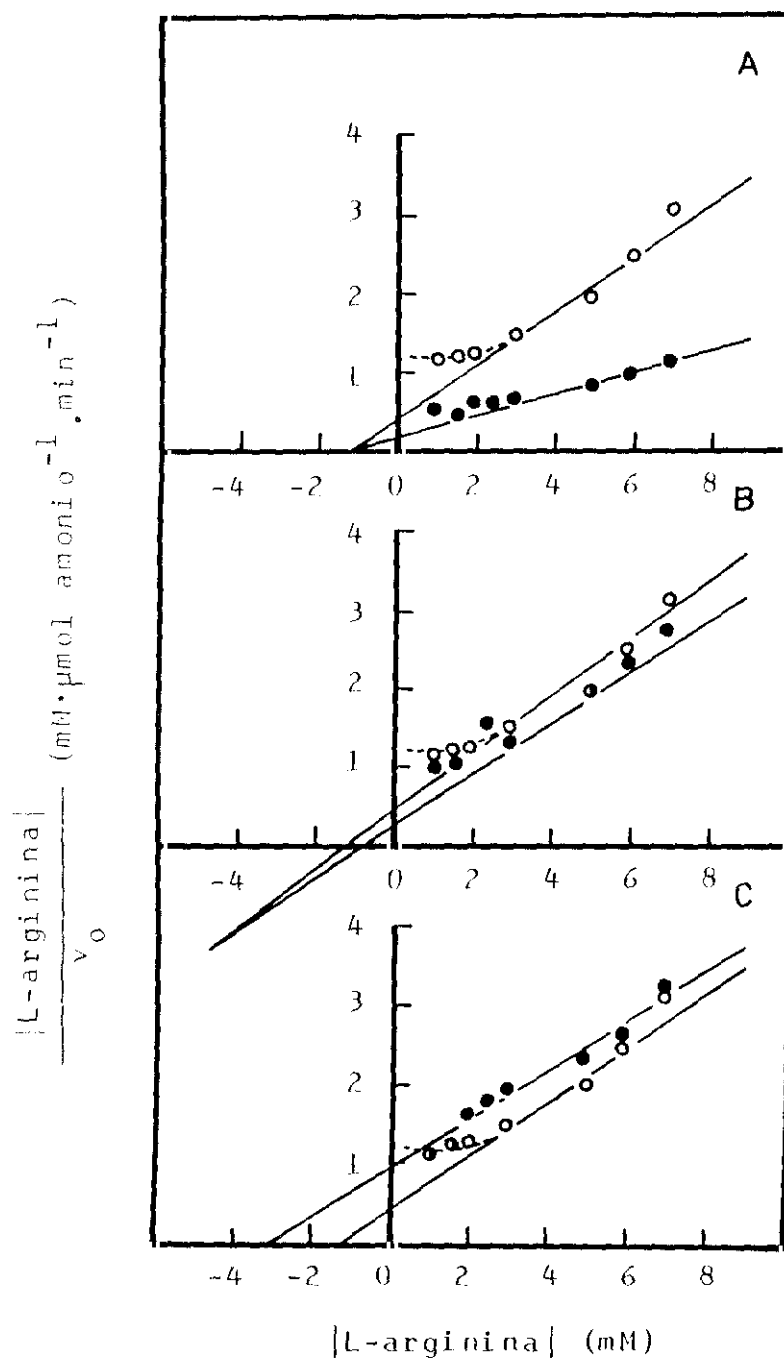


Figura 40.- Efecto de la concentración de L-arginina (O) sobre la velocidad de reacción de la isoforma III de arginasa a una concentración de $93 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. En (A), en presencia de atranorina 190 nM (●); en (B), en presencia de ácido evérnico 390,0 nM (●) y en (C), en presencia de ácido úsnico 470,0 nM (●).

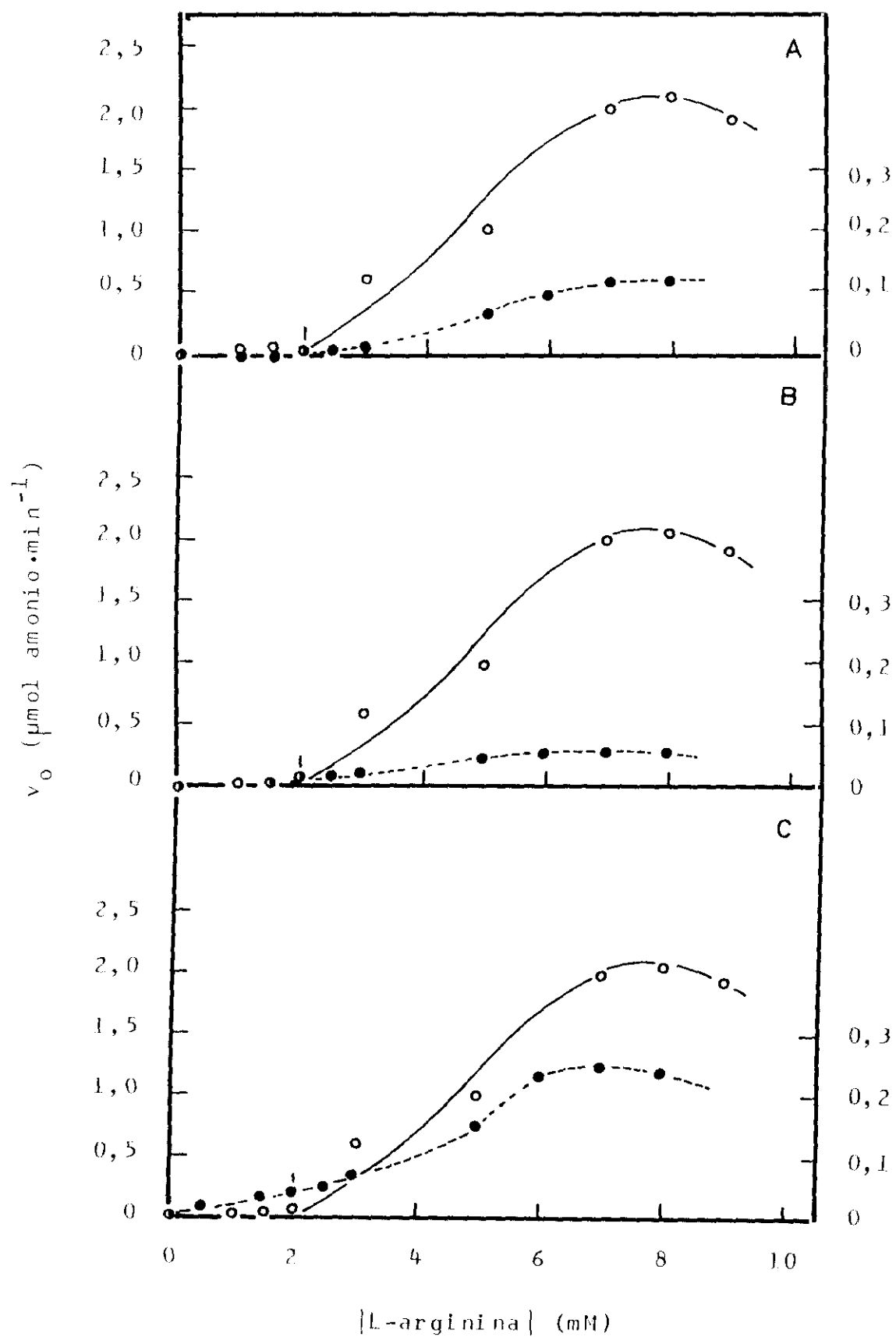


Figura 41.- Representación de Hill sobre la variación de la velocidad de reacción de la isoforma III de arginasa ($93 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (O) en función de la concentración de L-arginina. En (A), en presencia de atranorina 190 nM (●); en (B), en presencia de ácido evérnico 390,0 nm (●) y en (C), en presencia de ácido úsnico 470 nm (●).

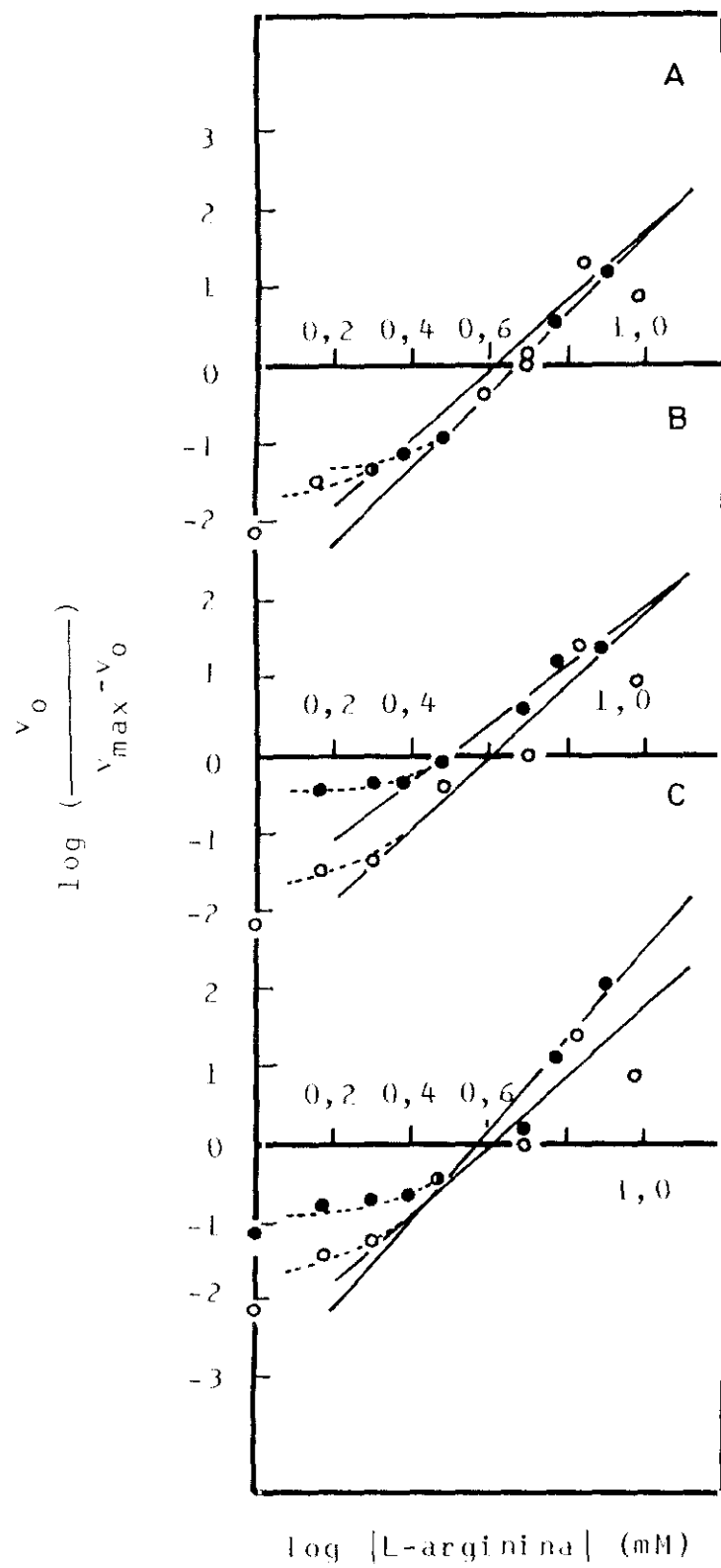


Figura 42.- Efecto de la concentración de L-arginina (O) sobre la velocidad de reacción de la isoforma IV de arginasa a una concentración de $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En (A), en presencia de atranorina 1,69 mM (●); en (B), en presencia de ácido evérnico 1,15 mM (●) y en (C), en presencia de ácido úsnico 1,27 mM (●).

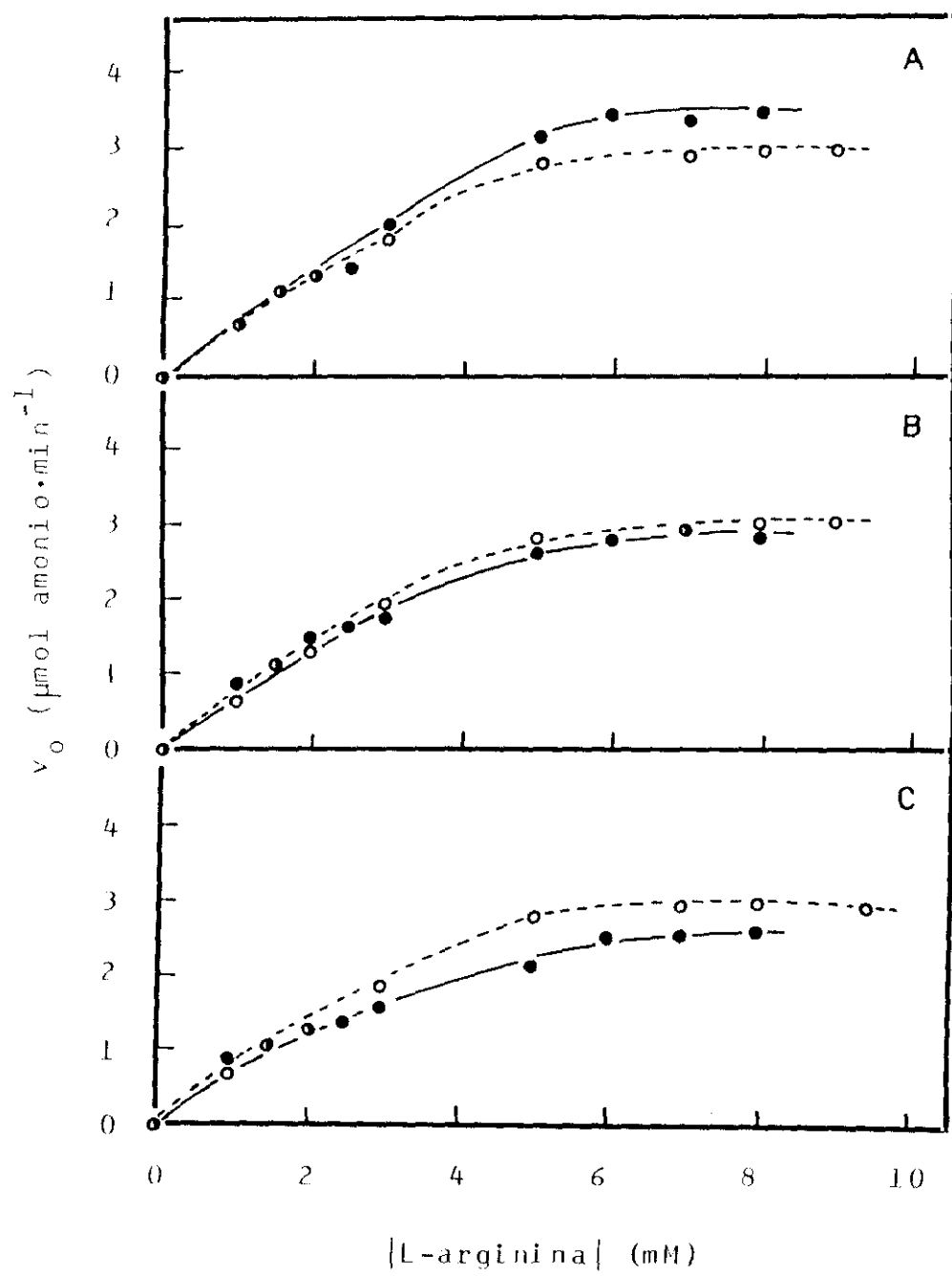


Figura 43.- Representación de Eisenthal-Cornish-Bowden para la determinación de K_m y v_{max} de la isoforma IV de arginasa.

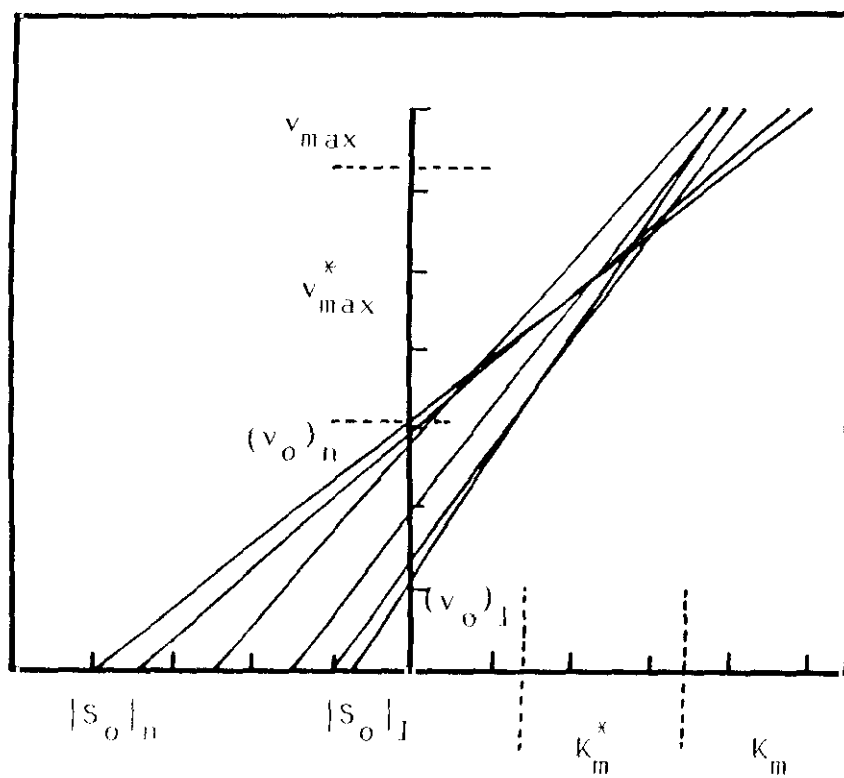


Figura 44.- Representación de Hanes sobre la variación de la velocidad de reacción de la isoforma IV de arginasa ($6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (○) en función de la concentración de L-arginina, $y = 0,72 + 0,24x$; $r = 0,98$. En (A), en presencia de atranorina 1,69 mM (●), $y = 0,24 + 0,25x$; $r = 0,99$; en (B), en presencia de ácido evérnico 1,15 mM (●), $y = 0,86 + 0,27x$; $r = 0,99$; y en (C), en presencia de ácido úsnico 1,27 mM (●), $y = 0,90 + 0,29x$; $r = 0,98$.

$$\frac{[L\text{-arginina}]}{v_0} \quad (\text{mM} \cdot \mu\text{mol amonio}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$$

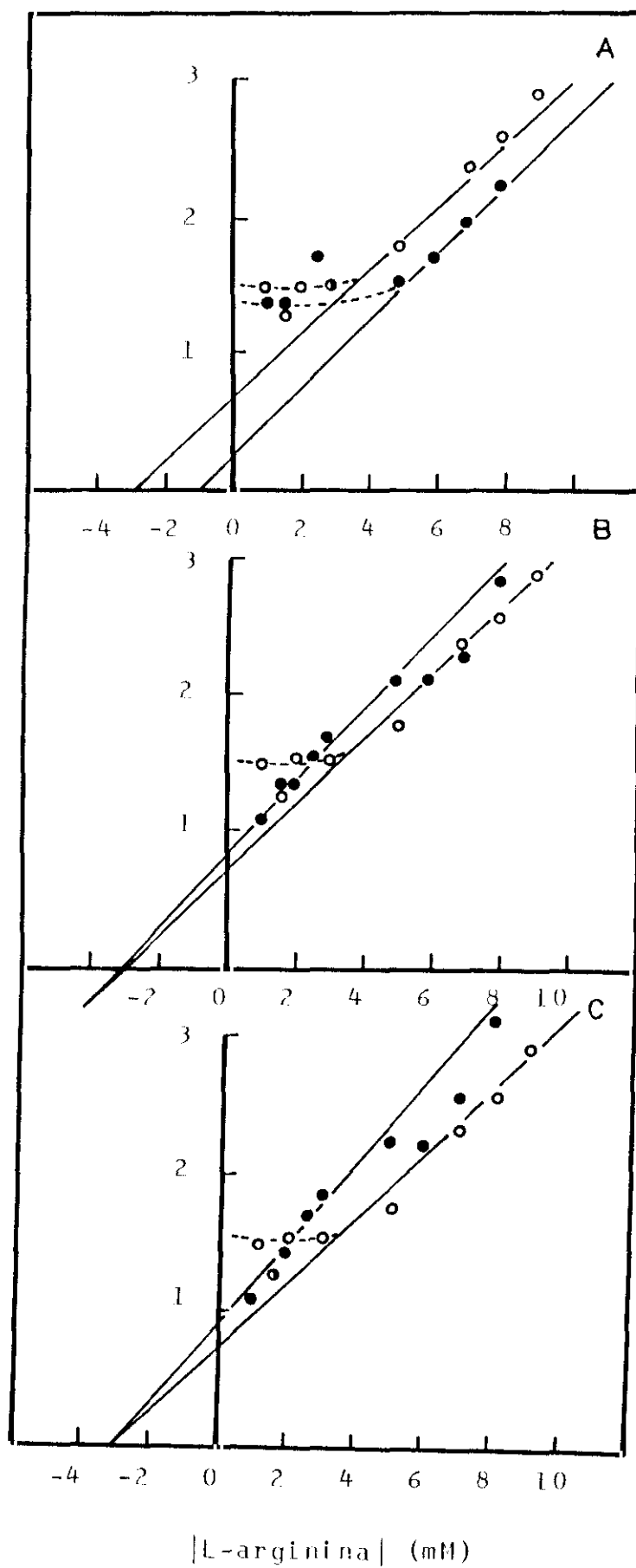


Tabla XIII.- Constantes cinéticas de las isoformas I, III y IV de arginasa, obtenidas mediante diferentes representaciones gráficas

| Isoforma de arginasa | Representación | K_m (mM) | $K_m(ap)$ (mM) | | | V_{max} ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1}$) | $V_{max}(ap)$ ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1}$) | | |
|----------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|---|----------------|--------------|
| | | | atranorina | ácido evérnico | ácido úsnico | | atranorina | ácido evérnico | ácido úsnico |
| I | Directa | 1,50 | | | | 2,49 | | | |
| | Eisenthal-Cornish-Bowden | 4,90 | | | | 5,25 | | | |
| | Hanes | 1,25 | 1,10 Activador no competitivo | 0,68 Activador mixto | 3,40 Inhibidor competitivo | 2,79 | 6,64 | 2,75 | 3,32 |
| III | Directa | 4,5* | 4,90** Inhibidor | 4,40** Inhibidor | 4,50** Inhibidor | 2,12 | 0,12 | 0,06 | 0,25 |
| IV | Directa | 2,45 | | | | 3,00 | | | |
| | Eisenthal-Cornish-Bowden | 4,00 | | | | 4,70 | | | |
| | Hanes | 3,00 | 0,96 Activador mixto | 3,16 Inhibidor no competitivo | 3,05 Inhibidor no competitivo | 4,20 | 3,95 | 3,69 | 3,39 |

* Representa el valor de $S_{0,5} \simeq K_m$ ** Representa el valor de $S_{0,5}(ap)$

III.5.- EVALUACION DE LA COOPERATIVIDAD. ECUACION DE HILL

En este bloque se presenta la Tabla XIV

En algunas enzimas, la presencia de efectores modifica el patrón de unión al sustrato, bien facilitándola (cooperatividad positiva), bien dificultando dicha unión (cooperatividad negativa). Con objeto de evaluar esta posible cooperatividad se eligió la representación de Hill. En la Tabla XIV se muestran las ecuaciones de las rectas, ajustadas por mínimos cuadrados, resultantes de la representación de los resultados $\log\left(\frac{V_0}{V_{\max} - V_0}\right)$ frente a $\log [L\text{-arginina}]$ de las tres isoformas, I, III y IV, de arginasa, en ausencia y presencia de los tres efectores (atranorina y ácidos evérnico y úsnico).

Como puede observarse, el valor de "h", pendiente de la recta, es menor de 1,5 en las rectas correspondientes a las isoformas I y IV. Esta pendiente adquiere un valor de 4,4 en la recta correspondiente a la isoforma de arginasa III.

Las pendientes de las rectas que corresponden a la isoforma I en presencia de efectores no se modifica sustancialmente respecto a aquella obtenida en su ausencia. Las pendientes de las rectas que corresponden a la isoforma III son 3,75 en presencia de ácido evérnico; 5,15 en presencia de atranorina y 5,74 en presencia de ácido úsnico.

Las pendientes de las rectas correspondientes a la isoforma IV no varían en presencia de ácido evérnico ni de ácido úsnico (1,25 y 1,20, respectivamente), pero en presencia de atranorina adquiere un valor de 1,94. Estos valores han de compararse con la pendiente obtenida en ausencia de efector, igual a 1,24.

Tabla XIV.- Ecuaciones de las rectas, ajustadas por mínimos cuadrados, obtenidas mediante la representación de Hill, para la evaluación de la cooperatividad de las isoformas I, III y IV de arginasa en presencia y/o ausencia de efectores.

| Isoforma de arginasa | Ecuación de la recta | | | |
|----------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Sin efector | Con efector | | |
| | | Atranorina (μM) | Acido evérnico (μM) | Acido úsnico (μM) |
| I | $y = -0,358 + 0,42 \cdot x$ $r = 0,98$ | $y = -0,45 + 1,55x$ $r = 0,98$ | $y = -0,33 + 1,65x$ $r = 0,97$ | $y = -0,49 + 0,93x$ $r = 0,98$ |
| III | $y = -2,67 + 4,40x$ $r = 0,96$ | $y = -3,41 + 5,15x$ $r = 0,99$ | $y = -1,88 + 3,75x$ $r = 0,97$ | $y = -3,34 + 5,74x$ $r = 0,95$ |
| IV | $y = -0,68 + 1,24x$ $r = 0,99$ | $y = -0,79 + 1,94x$ $r = 0,98$ | $y = -0,55 + 1,25x$ $r = 0,97$ | $y = -0,52 + 1,20x$ $r = 0,97$ |

* El valor de la pendiente, h (constante de Hill), da una idea del grado de cooperatividad. Para valores de $h \approx 1$, no hay cooperatividad. (Fersht, 1985)

III.6.- LIGAMIENTO DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO A LAS ISOFORMAS I, III Y IV DE ARGINASA

En este bloque se presentan las Figuras 45 a 62 y la Tabla XV

La unión de una molécula de efector a una proteína es el primer paso de su regulación. Con objeto de analizar este posible fenómeno, se realizaron estudios de ligamiento mediante el método tradicional de equilibrio de diálisis, descrito en el apartado II.14 de Material y Métodos. Para la elaboración de los resultados se eligieron diferentes representaciones gráficas.

III.6.1.- Ligamiento a la isoforma I

Para poder determinar la unión efector-proteína es indispensable conocer, en primer lugar, el tiempo necesario para que el ligando libre se encuentre en equilibrio. En la Tabla XV se recogen estos resultados. El tiempo requerido para detectar atranorina libre en equilibrio entre las dos subcámaras de diálisis es de 6 h; el del ácido evérnico de 4,5 h y el del ácido úsnico de 14 h. Los tiempos de equilibrio no varían en función de la isoforma de arginasa, siendo el mismo en todos los casos.

III.6.1.1.- Atranorina como ligando

La cinética de saturación del ligamiento (ligando unido frente a ligando total) de atranorina se muestra en la Figura 45 A. La saturación de los sitios de la isoforma I se obtiene a partir de los 0,1 μ moles de atranorina total. En la Figura 45 B se muestra la representación de dobles inversas (r^{-1} frente a $[L]^{-1}$) de los resultados del ligamiento de atranorina. Los puntos obtenidos se pueden ajustar a una curva exponencial. La inversa del punto de corte con el eje de ordenadas, igual a 4,0, proporciona el número aproximado de sitios de unión que posee la proteína para el efector. Por tanto, el número de sitios de unión para atranorina en la isoforma I de arginasa es cuatro por molécula de proteína.

La representación de Scatchard ($r/[L]$ frente a r) del ligamiento de atranorina se muestra en la Figura 46 A. Los puntos obtenidos no pueden asimilarse a una recta, hecho que será explicado posteriormente, sino que se ajustan a una parábola.

La representación semilogarítmica (r frente a $\log [\text{efector}]$) permite obtener un espaciado uniforme de los resultados, lo que facilita la valoración del número de sitios de unión por molécula de proteína, hecho que, en otro tipo de representaciones, puede quedar enmascarado. La representación semilogarítmica del ligamiento de atranorina a la isoforma I se muestra en la Figura 46 B. El número de sitios de unión por molécula de proteína, estimado por intersección en el eje de ordenadas del nivel de saturación, es de $\simeq 4,0$.

III.6.1.2.- Ácido evérnico como ligando

La cinética de saturación del ligamiento de ácido evérnico a la isoforma I se muestra en la Figura 47 A. Como puede observarse, dicha saturación se produce a partir de 0,05 μmoles de ácido evérnico total. En la Figura 47 B se muestra la representación de dobles inversas. El número de sitios de unión por molécula de proteína, estimado en esta curva exponencial, es de $\simeq 4,0$. La representación de Scatchard se muestra en la Figura 48 A. Como puede observarse, existe igualmente un alejamiento de la linearidad en los puntos. La representación semilogarítmica del ligamiento del ácido evérnico a la isoforma I se muestra en la Figura 48 B. El número de sitios de unión por molécula de proteína se estimó entre 4 y 5.

III.6.1.3.- Ácido úsnico como ligando

La cinética de saturación del ligamiento de ácido úsnico a la isoforma I de arginasa se muestra en la Figura 49 A. La saturación se produce a partir de 0,05 μmoles de ácido úsnico total. En la Figura 49 B se muestra la representación de dobles inversas. La curva exponencial que se obtiene al ajustar los puntos proporciona un valor estimado de 10 sitios de unión por molécula de proteína. En la representación de Scatchard (Fig. 50 A), los puntos se ajustan casi a una recta y no a una parábola, como ocurre con el ligamiento de atranorina y ácido evérnico. El punto de corte con el eje de abscisas da un número de sitios de unión para el ácido úsnico por molécula de isoforma I $\simeq 10,0$. Este valor también concuerda con el obtenido a partir de la representación

semilogarítmica (Fig. 50 B). También debe resaltarse en este punto que el ácido úsnico es inhibidor competitivo de la isoforma I de arginasa, es decir compite con la L-arginina por el centro activo de la proteína (Tabla XIII).

III.6.2.- Ligamiento a la isoforma III

III.6.2.1.- Atranorina como ligando

La Figura 51 A muestra la cinética de saturación del ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa. Los sitios de unión en la proteína se saturan a partir de 0,07 μ moles de atranorina total. Sin embargo, para valores superiores de ligando total, puede verse una disminución de la cantidad de atranorina unida. Este fenómeno también se observa en la representación semilogarítmica (Fig. 52 B). En la representación de dobles inversas (Fig 51 B), los puntos se pueden ajustar a una curva exponencial, cuya inversa del punto de corte en el eje de ordenadas da un valor de 26 sitios de unión por molécula de enzima. O, lo que es lo mismo, una alta inespecificidad de unión. La representación de Scatchard se muestra en la Figura 52 A. En este caso se puede observar una clara desviación de la linearidad de los puntos. Estos podrían ajustarse bien a una parábola o, como se intenta expresar con la línea discontinua, a un posible "ciclo de histéresis".

III.6.2.2.- Ácido evérnico como ligando

La cinética de saturación del ligamiento de ácido evérnico a la isoforma III de arginasa se muestra en la Figura 53 A. La cinética, que es hiperbólica, muestra la saturación a partir de 0,075 μ moles de ácido evérnico total. En la Figura 53 B se muestra la representación de dobles inversas. La curva exponencial que se obtiene en el ajuste de los puntos proporciona un valor estimado de 8 sitios de unión por molécula de proteína. En la representación de Scatchard (Fig. 54 A), los puntos se alejan de la linearidad, ajustándose a una parábola. El valor del número de sitios de

unión del ácido evérnico a la isoforma III de arginasa, obtenido mediante la representación semilogarítmica, da un valor de 6 (Fig 54 B), algo menor que el obtenido a partir de la representación de dobles inversas ($n=8$).

III.6.2.3.- Ácido úsnico como ligando

La Figura 55 A muestra la cinética de saturación del ligamiento del ácido úsnico a la isoforma III de arginasa. Los sitios de unión de la proteína se saturan a partir de 0,14 μ moles de ácido úsnico total. En la representación de dobles inversas (Fig. 55 B), el ajuste de los puntos coincide con una curva exponencial cuya inversa del punto de corte con el eje de ordenadas permite estimar en 26 el número aproximado de sitios de unión por molécula de proteína. Es decir, en este caso existe una alta inespecificidad de unión. En la representación de Scatchard (Fig. 56 A) los puntos se pueden ajustar a una parábola, tal como ocurre en los casos del ligamiento del ácido evérnico a la isoforma III. El número de sitios de unión para el ácido úsnico por molécula de isoforma III es de $\simeq 28$, según se deduce de los resultados obtenidos en la representación semilogarítmica.

III.6.3.- Ligamiento a la isoforma IV

III.6.3.1.- Atranorina como ligando

La cinética de saturación del ligamiento de atranorina a la isoforma IV de arginasa se muestra en la Figura 57 A. Como puede observarse, dicha saturación se produce a partir de 0,18 μ moles de atranorina total. En la Figura 57 B se muestra la representación de dobles inversas. El número de sitios de unión para atranorina es de $\simeq 23$, lo que nuevamente demuestra una alta inespecificidad en la unión. La representación de Scatchard se muestra en la Figura 58 A. Como puede observarse, existe igualmente un alejamiento de la linealidad en los puntos. La

representación semilogarítmica del ligamiento de la atranorina a la isoforma IV se muestra en la Figura 58 B. El número de sitios de unión por molécula de proteína se estimó en 16.

III.6.3.2.- Ácido evérnico como ligando

La figura 59 A muestra la cinética de saturación del ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV de arginasa. Los sitios de unión en la proteína se saturan a partir de 0,015 μ moles de ácido evérnico total. Sin embargo, como ocurre en el ligamiento de atranorina a la isoforma III (Fig. 51 A), para valores del ligando total superiores a 0,015 μ moles, existe un descenso de la cantidad de ácido evérnico ligado. Este fenómeno también se observa en la representación semilogarítmica (Fig. 60 B). En la representación de dobles inversas (Fig. 59 B) los puntos se pueden ajustar a una curva exponencial cuya inversa del punto de corte en el eje de ordenadas da un valor de \simeq 5 sitios de unión por molécula de enzima. La representación de Scatchard se muestra en la Figura 60 A. En este caso se puede observar una clara desviación de la linealidad en los puntos. Estos podrían ajustarse a una parábola o, según se muestra con la representación discontinua, a un posible "ciclo de histéresis". Recordemos que el ácido evérnico actúa como inhibidor no competitivo de la isoforma IV, mientras que se comporta como activador mixto de la isoforma I (Tabla XIII).

III.6.3.3.- Ácido úsnico como ligando

La Figura 61 A muestra la cinética de saturación del ligamiento del ácido úsnico a la isoforma IV de arginasa. Los sitios de unión de la proteína para este efector se saturan a partir de 0,075 μ moles de ácido úsnico total. En la representación de dobles inversas (Fig. 61 B) el ajuste de los puntos coincide con una curva exponencial cuya inversa del punto de corte en el eje de ordenadas permite estimar en \simeq 32 el número de sitios o, lo que es lo mismo, vuelve a existir una altísima inespecificidad en la unión. En la representación de Scatchard (Fig. 62 A), los puntos se pueden ajustar a una parábola. El número de sitios de unión para el ácido úsnico por molécula de

isoenzima IV es de $\simeq 24$, según se deduce de los resultados obtenidos en la representación semilogarítmica (Fig. 62 B).

Tabla XV.- Tiempo requerido para el equilibrio del ligando libre en las dos subcámaras de la diálisis. Los detalles del experimento se describen en el apartado II.14.3 de Material y Métodos.

| Atranorina (0,08 mg·ml ⁻¹) como ligando | | | | Acido evérnico (0,05 mg·ml ⁻¹) como ligando | | | | Acido úsnico (0,05 mg·ml ⁻¹) como ligando | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|-------|---|--|----------------|------|---|--|----------------|------|
| Tiempo (h) | Atranorina (mg·ml ⁻¹) | | A/B | Tiempo (min) | Acido evérnico (mg·ml ⁻¹) | | A/B | Tiempo (h) | Acido úsnico (mg·ml ⁻¹) | | A/B |
| | Subcámara A | Subcámara B | | | Subcámara A | Subcámara B | | | Subcámara A | Subcámara B | |
| 1 | 0,035 | 0,146 | 0,24 | 2 | 0,048 | 0,113 | 0,43 | 2 | 0,016 | 0,246 | 0,06 |
| 2 | 0,053 | 0,125 | 0,42 | 45 | 0,072 | 0,102 | 0,70 | 4 | 0,027 | 0,073 | 0,37 |
| 3 | 0,063 | 0,084 | 0,75 | 90 | 0,078 | 0,095 | 0,82 | 6 | 0,028 | 0,064 | 0,44 |
| 4 | 0,046 | 0,050 | 0,091 | 150 | 0,079 | 0,092 | 0,85 | 8 | 0,036 | 0,062 | 0,58 |
| 5 | 0,040 | 0,045 | 0,088 | 180 | 0,085 | 0,084 | 1,01 | 10 | 0,056 | 0,065 | 0,86 |
| 6 | 0,064 | 0,064 | 1,00 | 225 | 0,083 | 0,084 | 0,98 | 12 | 0,061 | 0,071 | 0,86 |
| 7 | 0,059 | 0,072 | 0,82 | 285 | 0,087 | 0,089 | 0,97 | 14 | 0,076 | 0,074 | 1,02 |
| | | | | | | | | 16 | 0,073 | 0,074 | 0,99 |

Figura 45.- Ligamiento de atranorina a la isoforma I de arginasa a una concentración 2,55 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste de la curva exponencial es $y = 0,25 \cdot e^{28,20 x}$; $r = 0,89$.

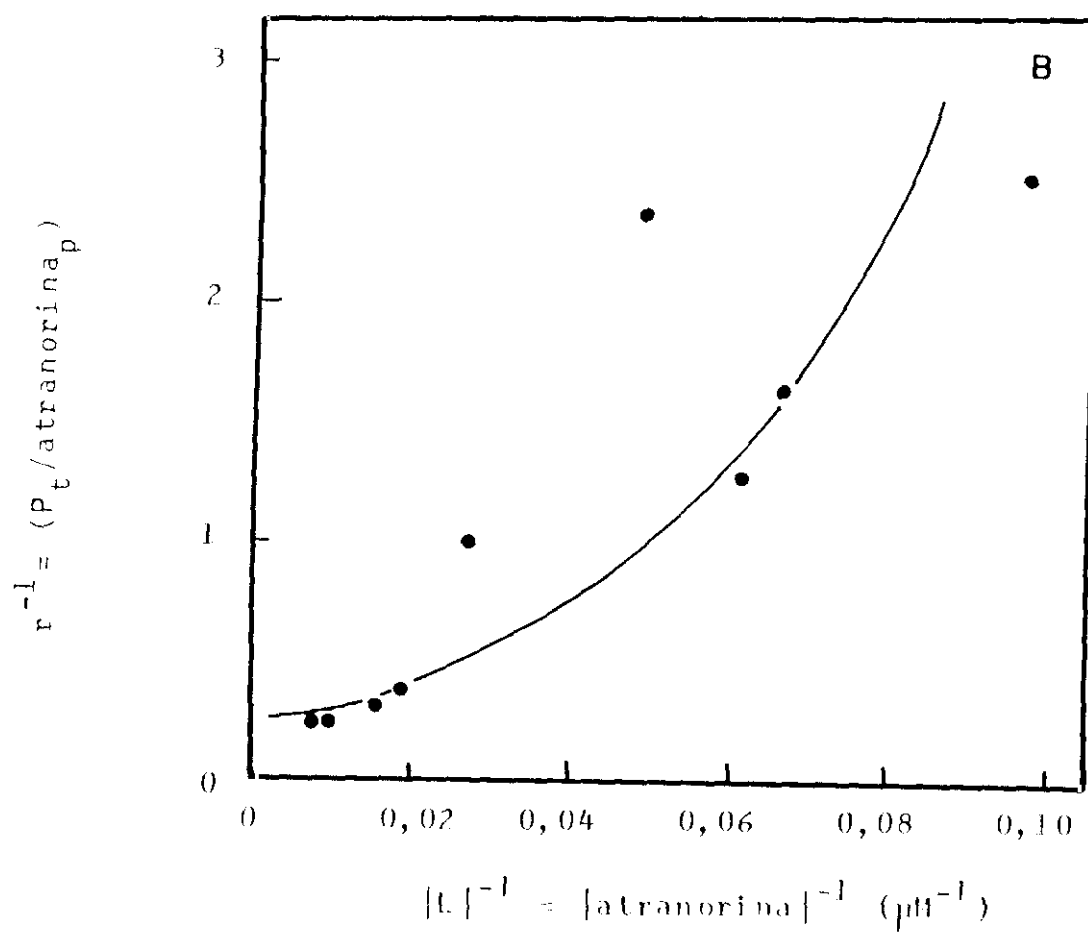
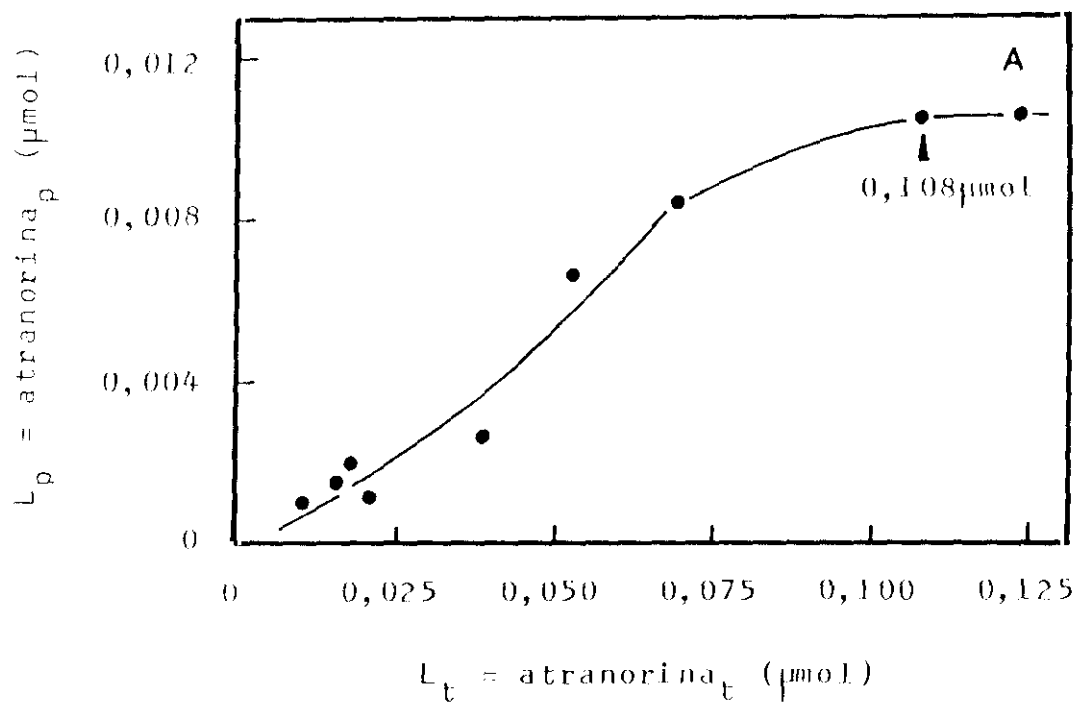


Figura 46.- Ligamiento de atranorina a la isoforma I de arginasa a una concentración 2,55 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

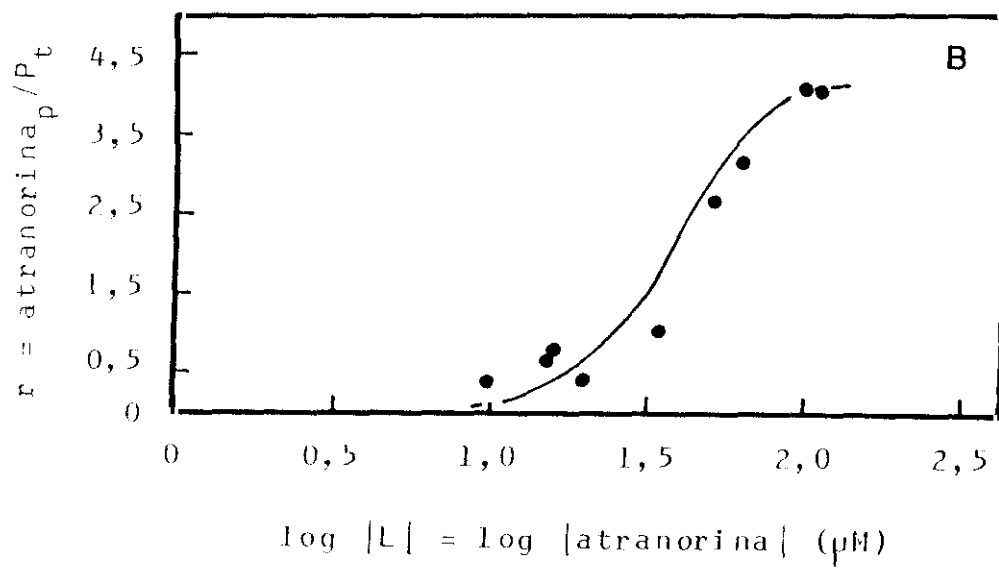
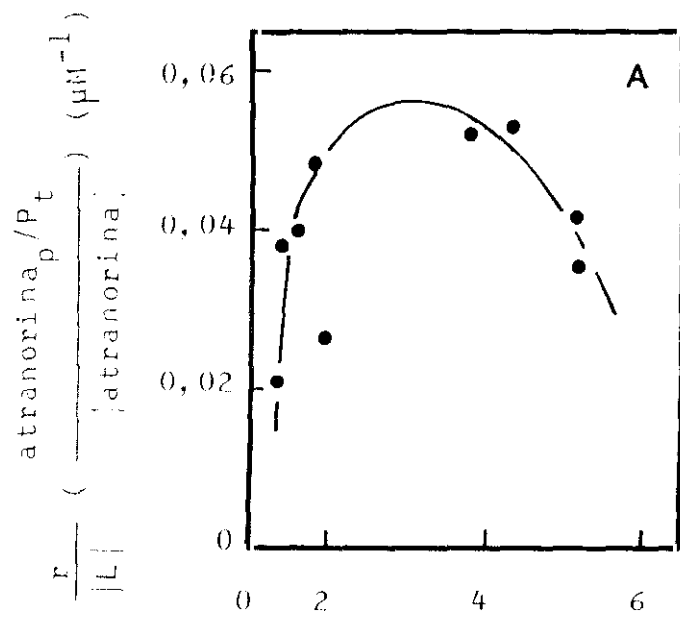


Figura 47.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma I de arginasa a una concentración de 2,55 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste de la curva exponencial es $y = 0,23 \cdot e^{4,76 x}$; $r = 0,93$.

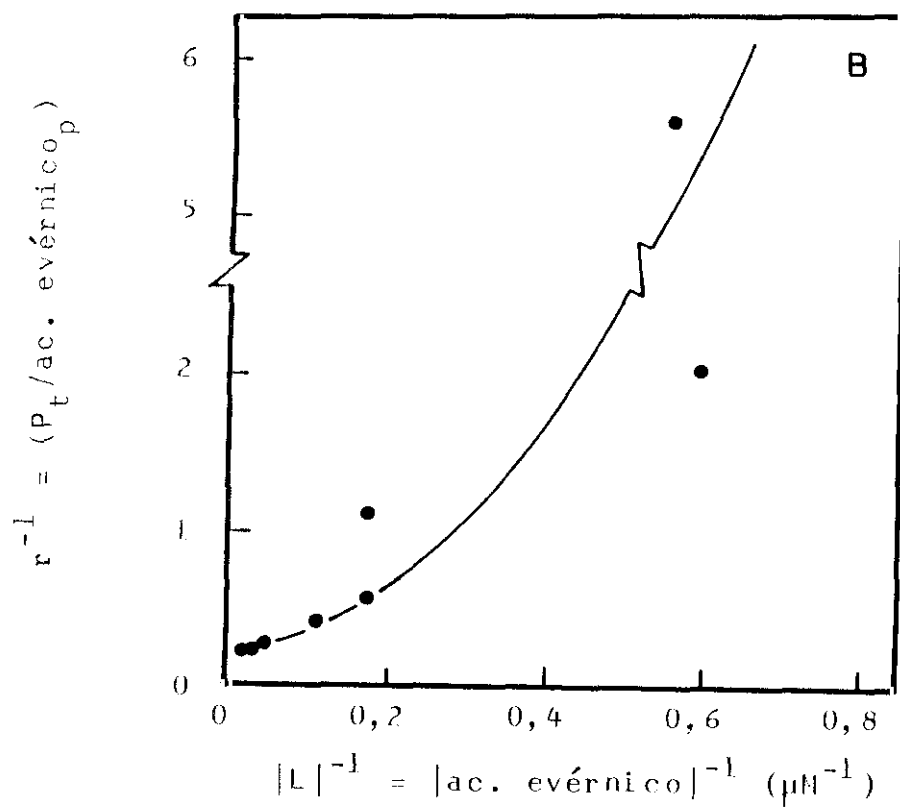
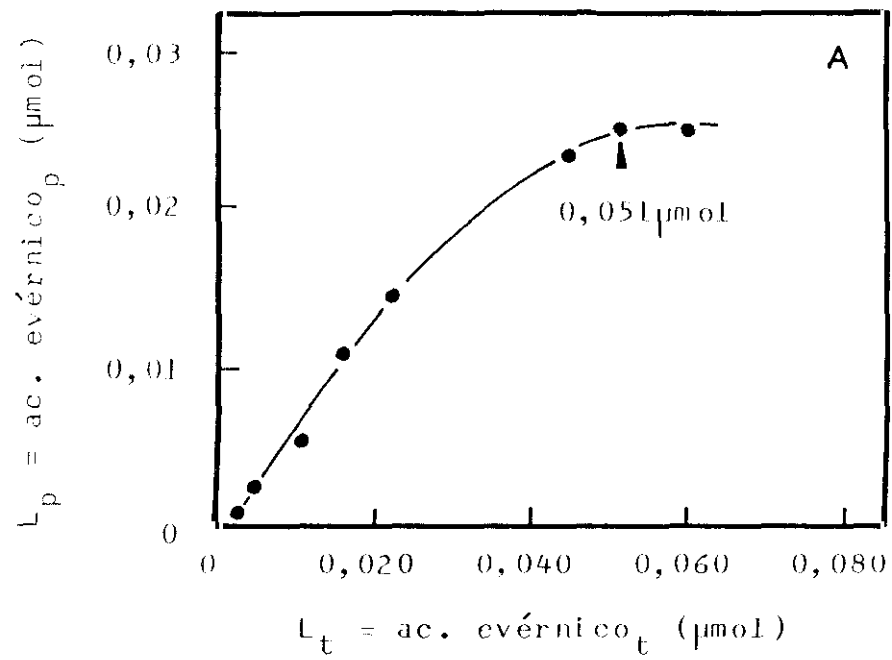


Figura 48.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma I de arginasa a una concentración 2,55 μM . En (A), representación de Scatchard, en (B), representación semi-logarítmica.

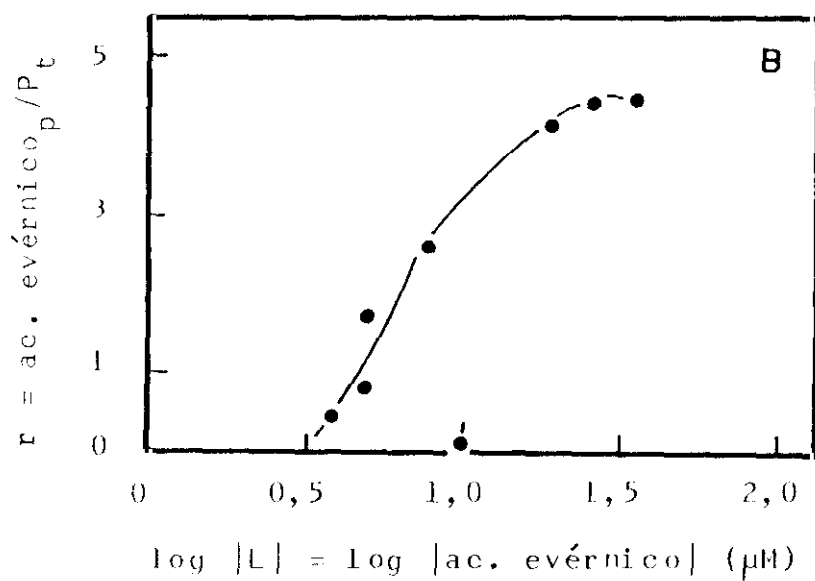
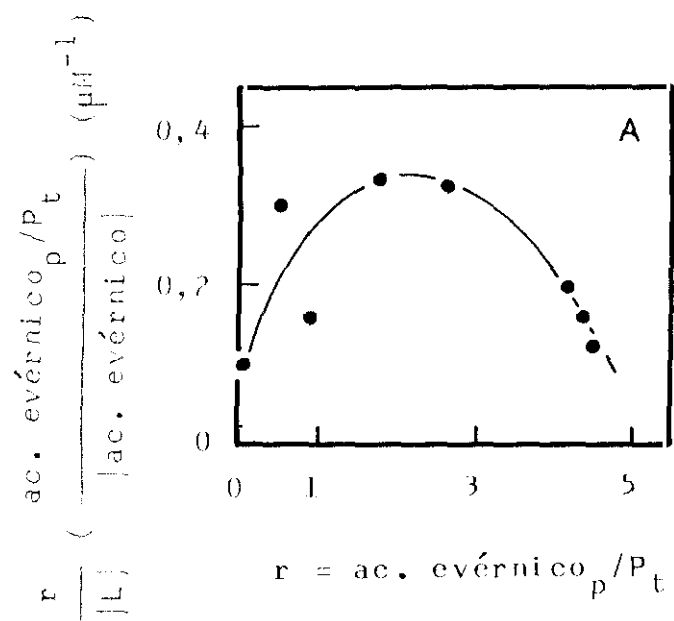


Figura 49.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma I de arginasa a una concentración 2,55 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste de la curva exponencial es $y = 0,11 \cdot e^{4,76 x}$; $r = 0,92$.

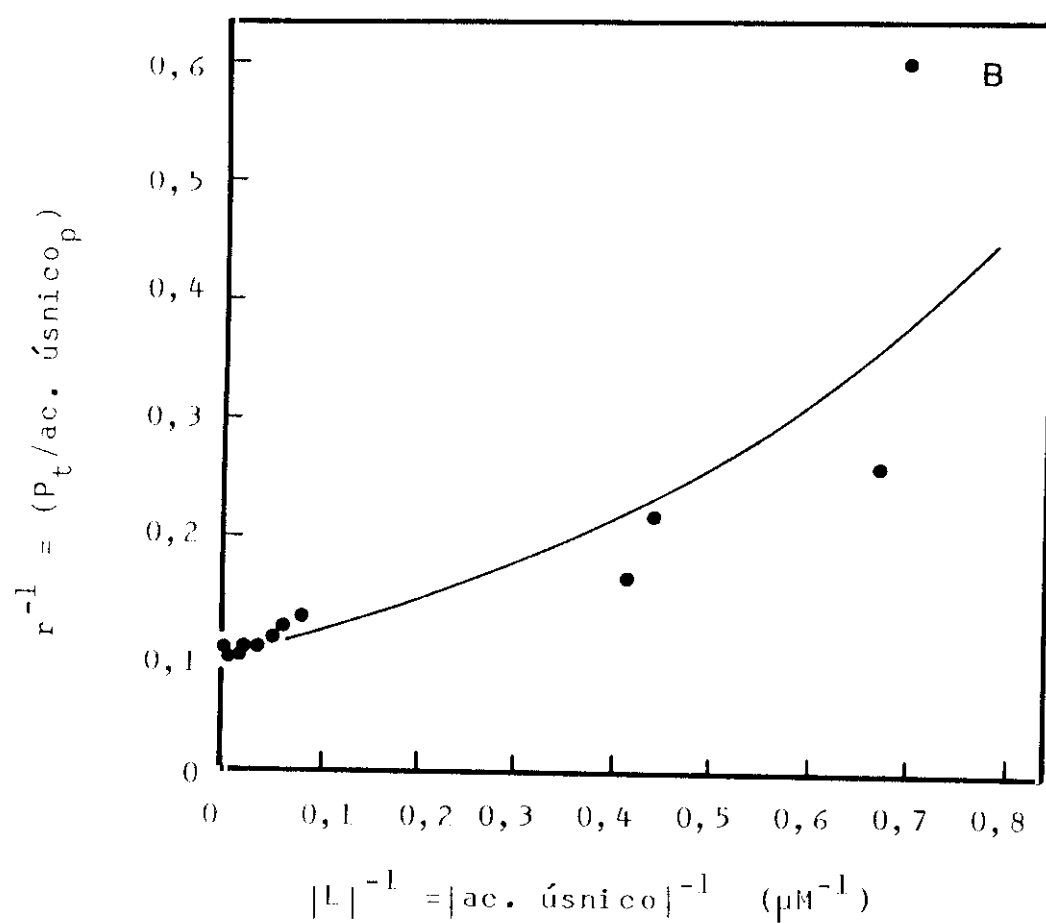
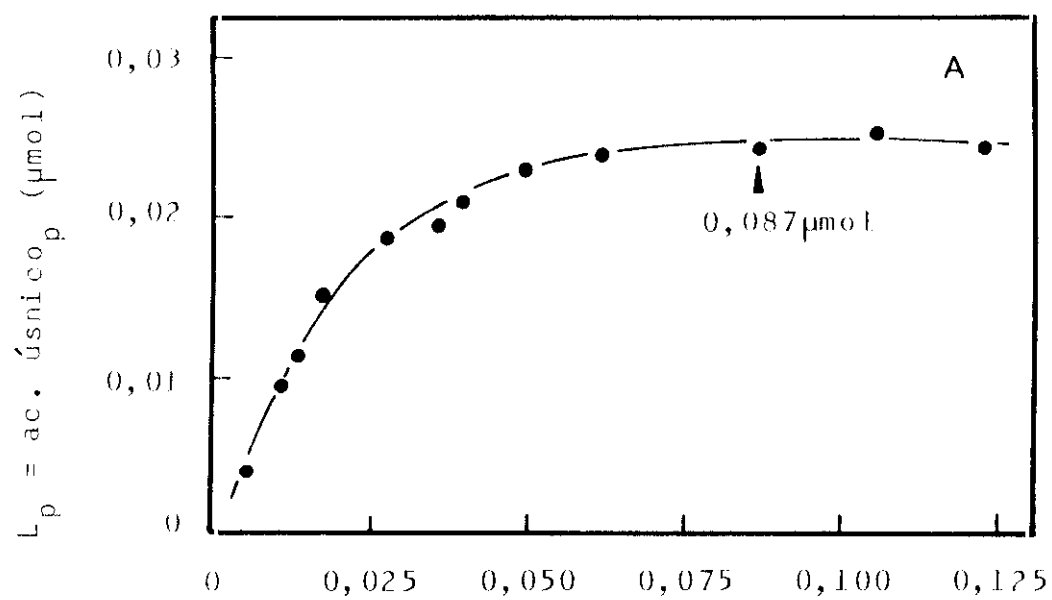


Figura 50.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma I de arginasa a una concentración 2,55 μ M. En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

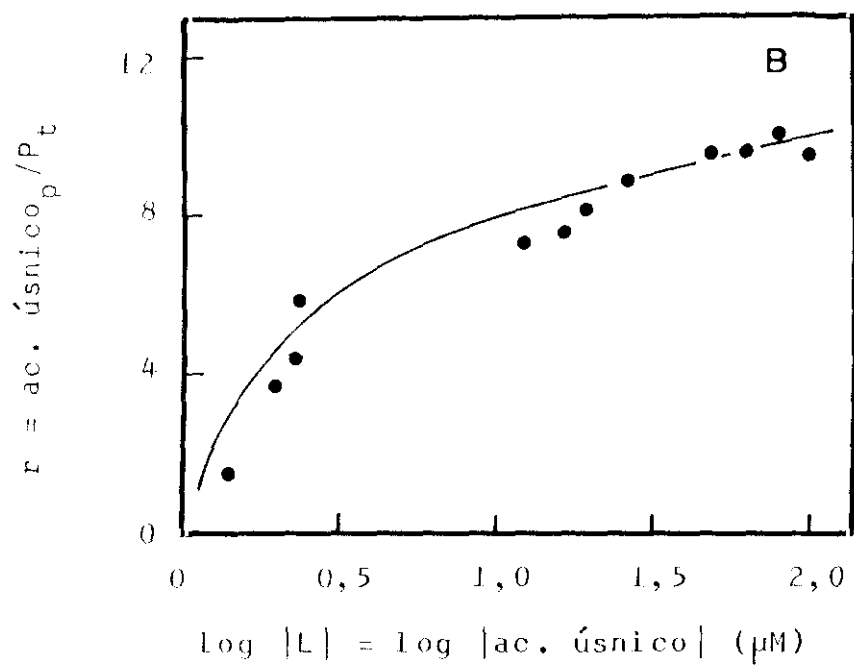
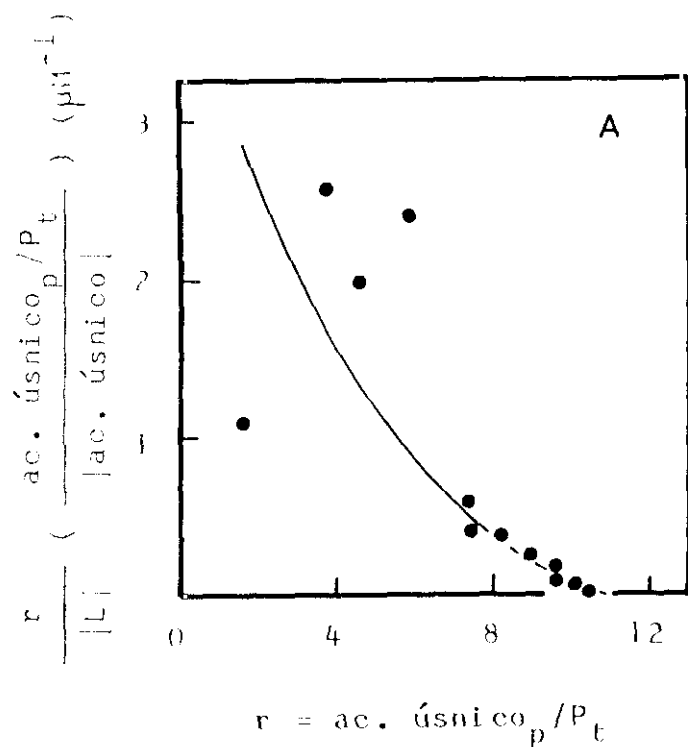


Figura 51.- Ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste a la curva exponencial es $y = 0,04 \cdot e^{39,38 x}$; $r = 0,96$.

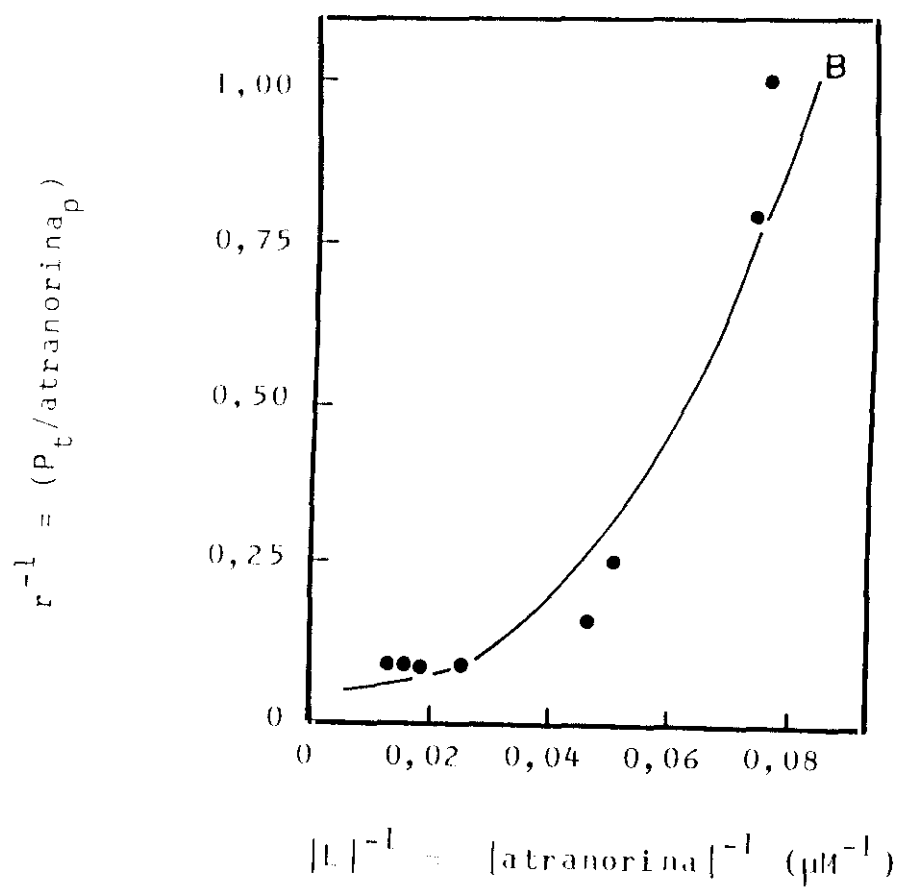
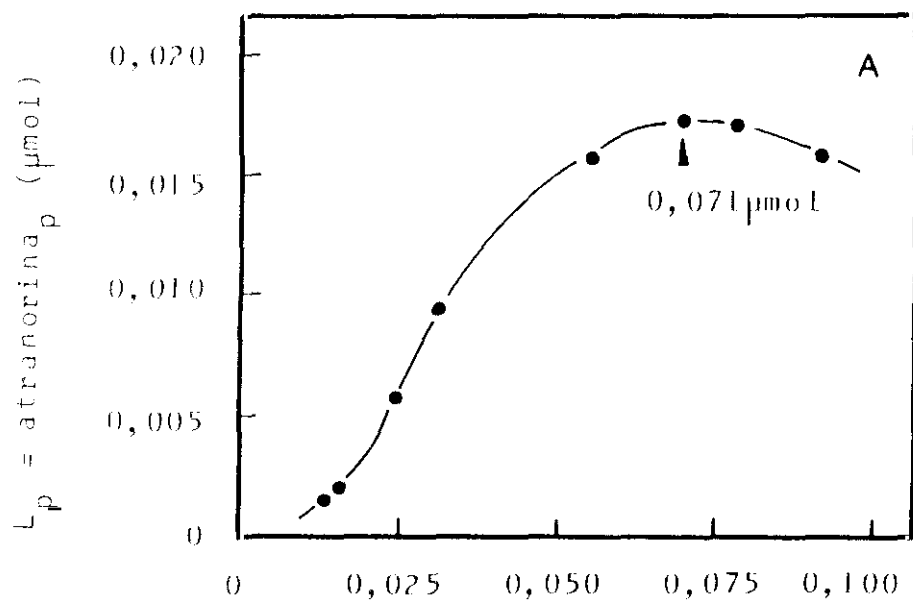


Figura 52.- Ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

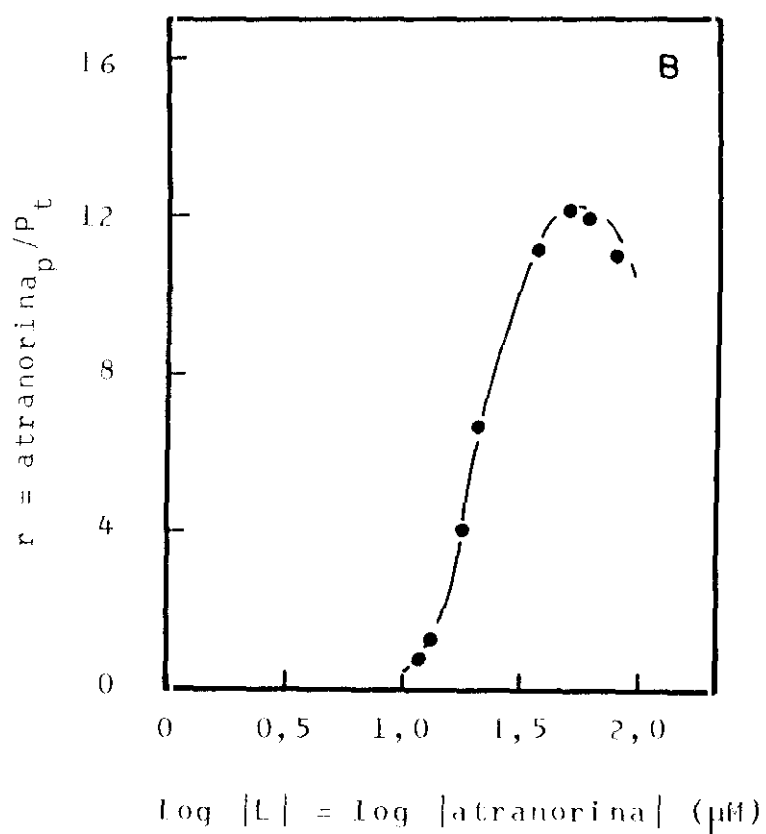
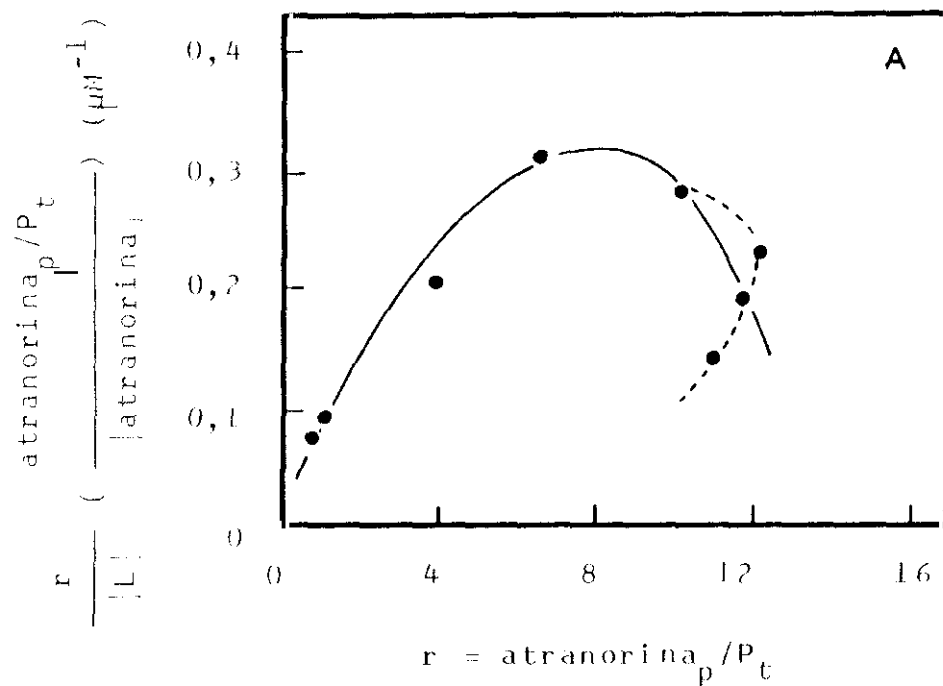


Figura 53.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste a la curva exponencial es $y = 0,13 \cdot e^{11,44 x}$; $r = 0,96$.

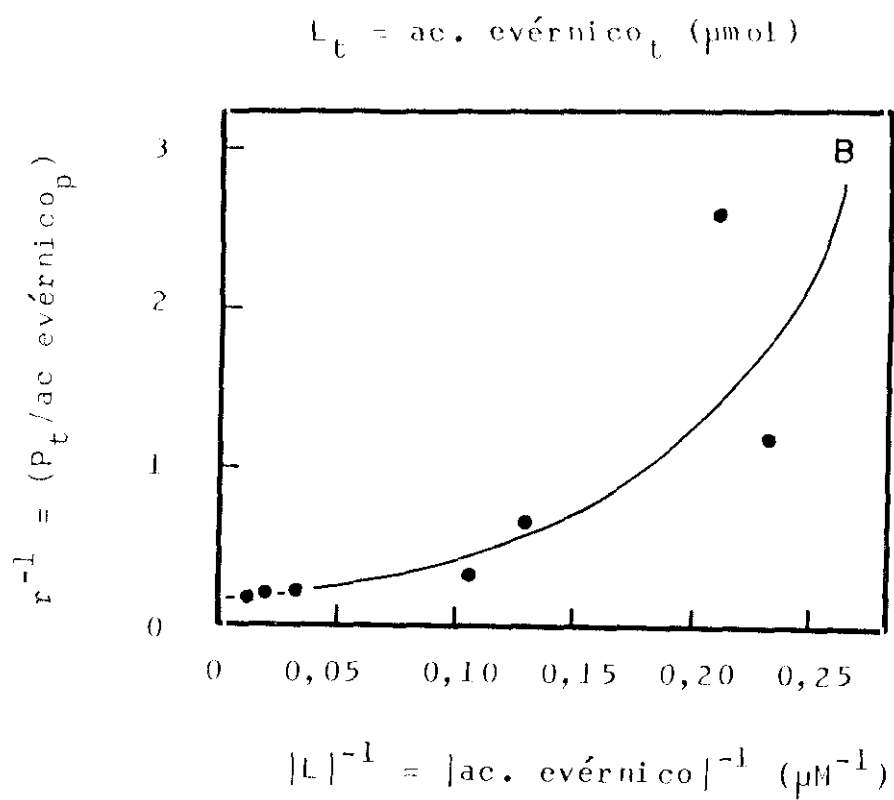
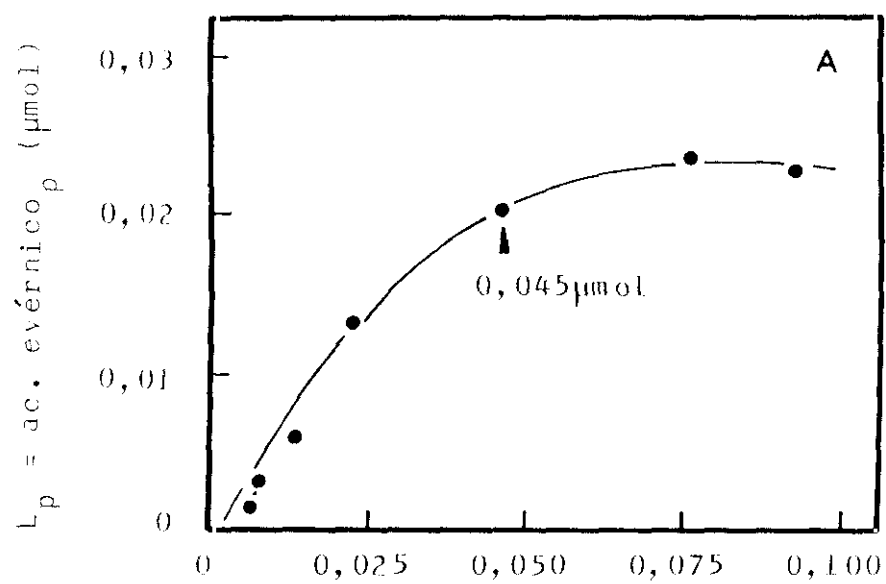


Figura 54.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

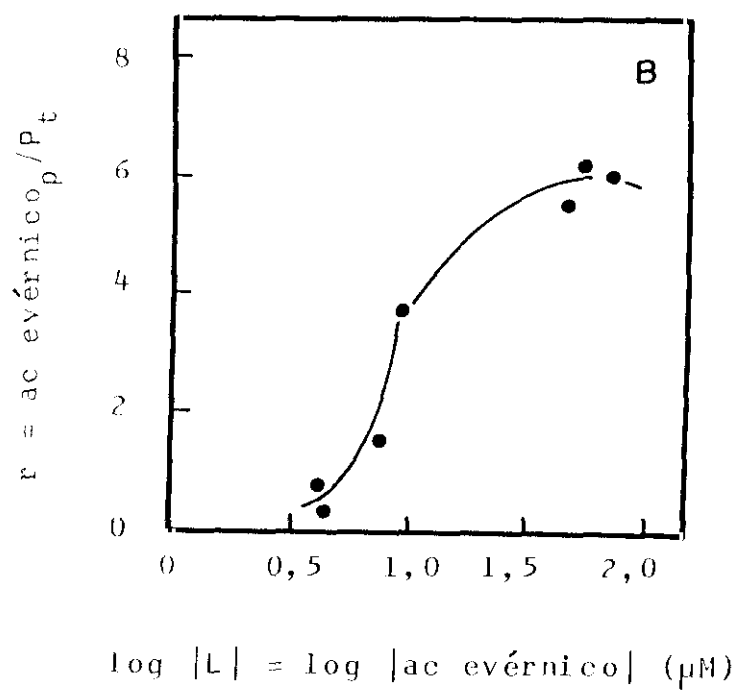
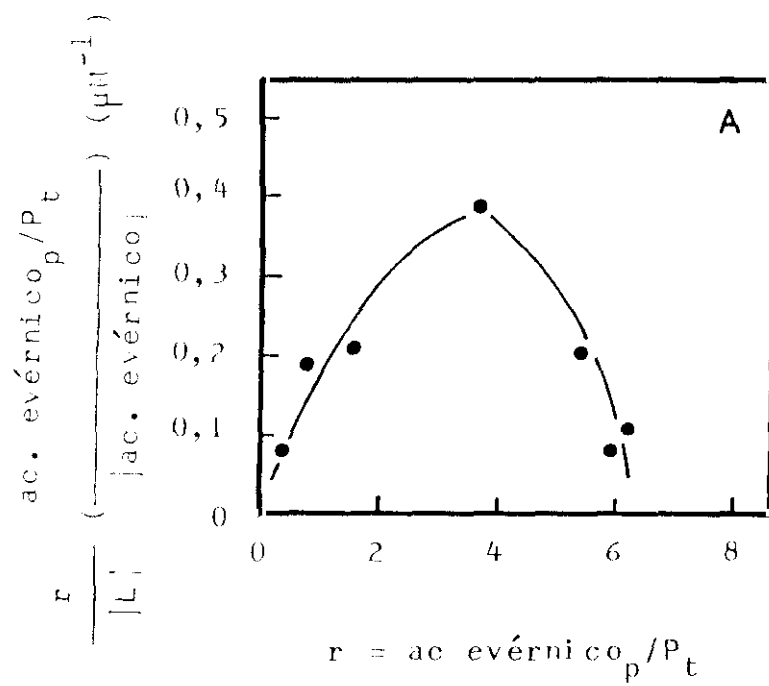


Figura 55.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste a la curva exponencial es $y = 0,04 \cdot e^{13,11 x}$; $r = 0,85$.

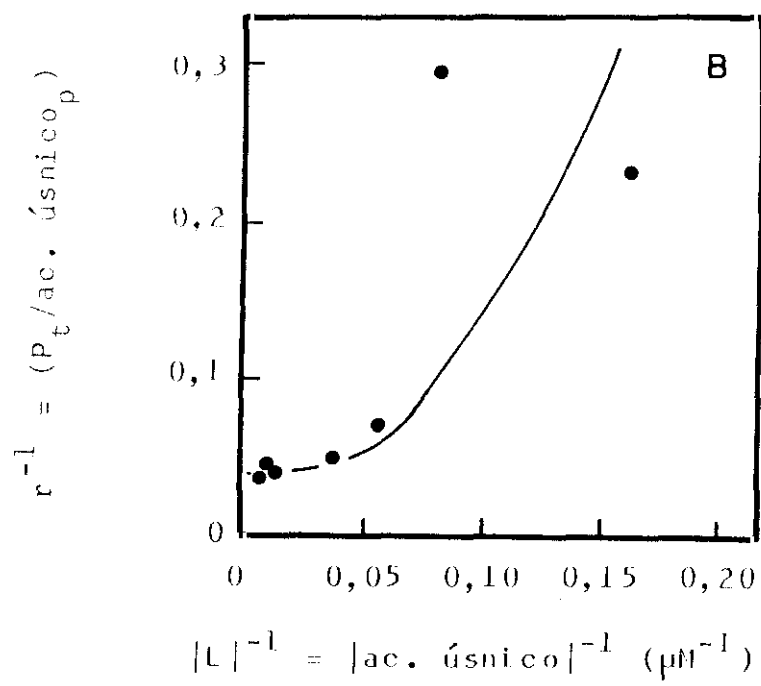
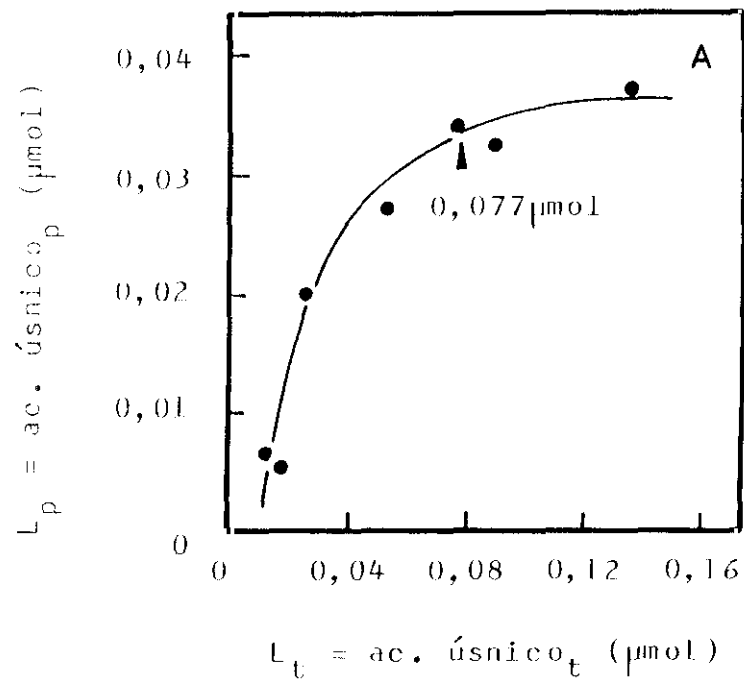


Figura 56.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma III de arginasa a una concentración 1,42 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semilogarítmica.

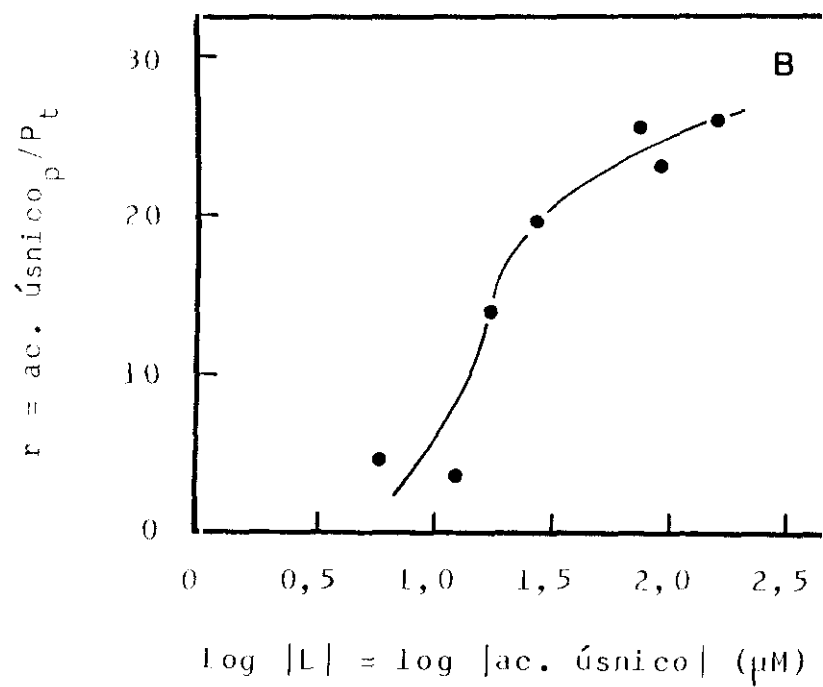
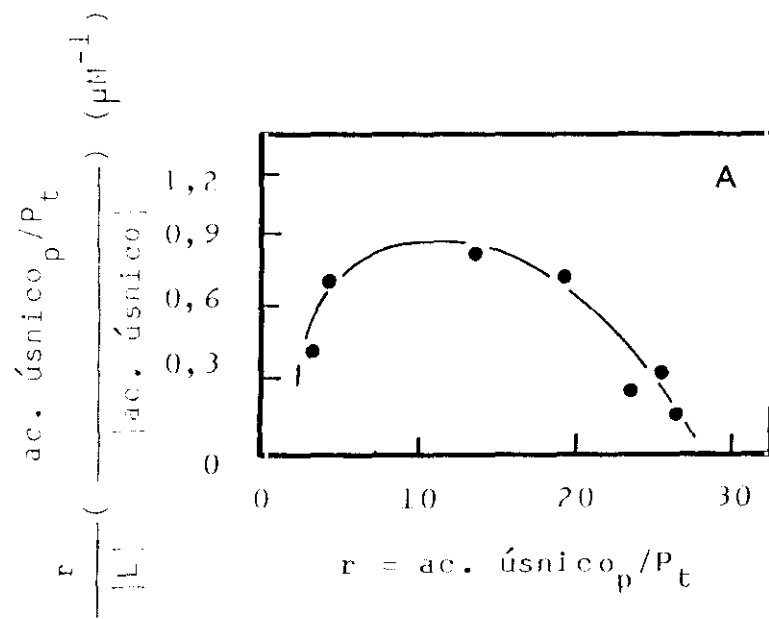


Figura 57.- Ligamiento de atranorina a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste de la curva exponencial es $y = 0,04 \cdot e^{71,70 x}$; $r = 0,98$.

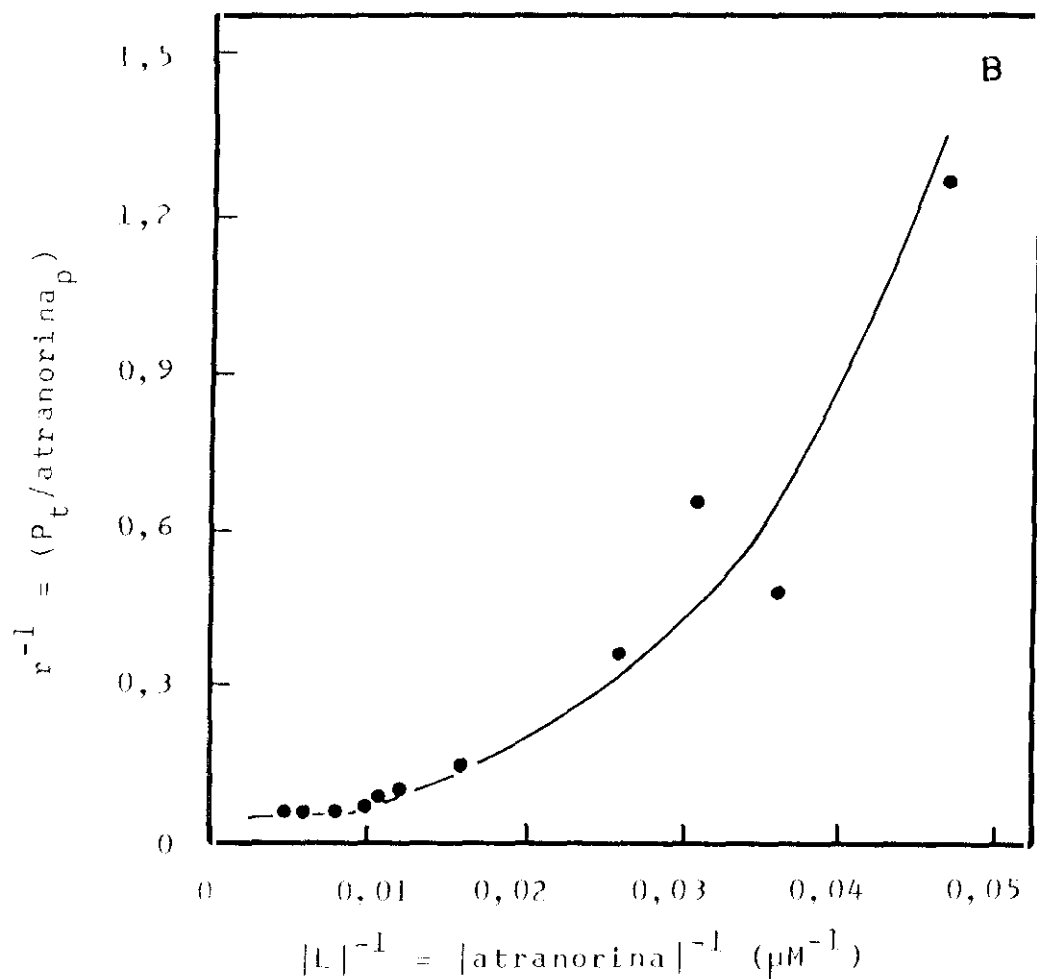
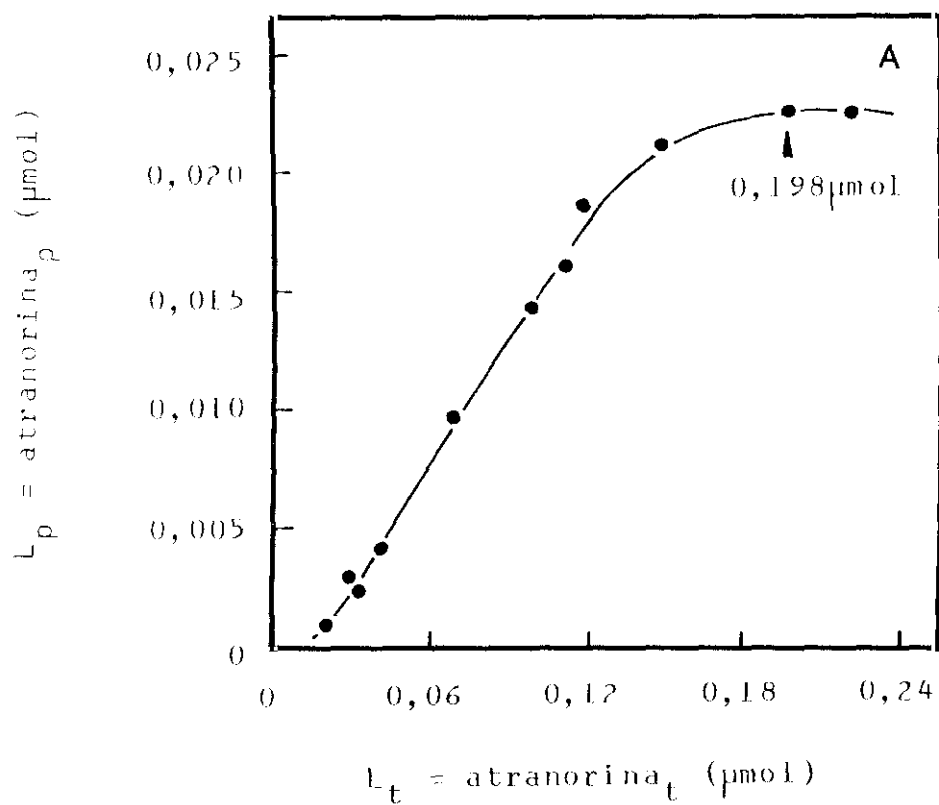


Figura 58.- Ligamiento de atranorina a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

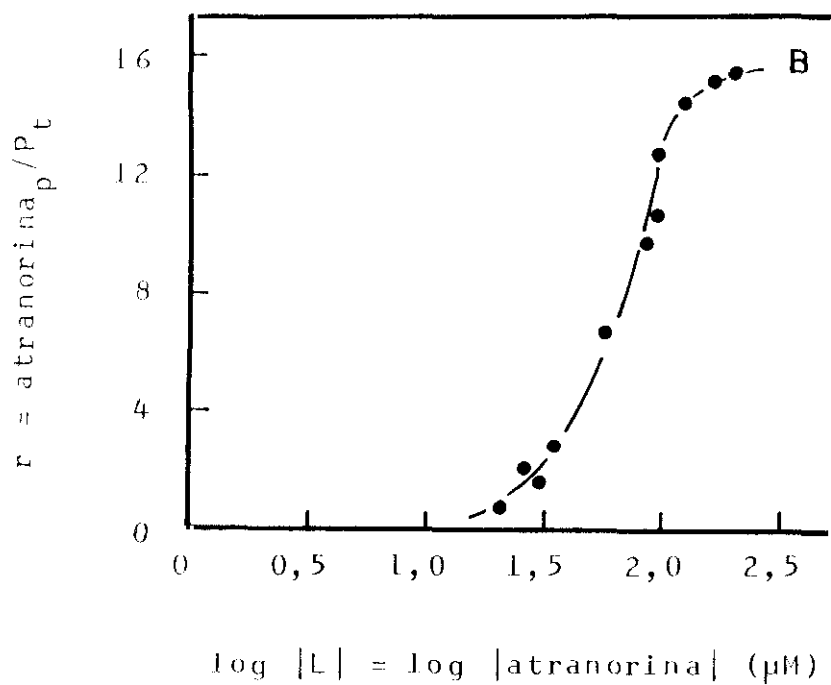
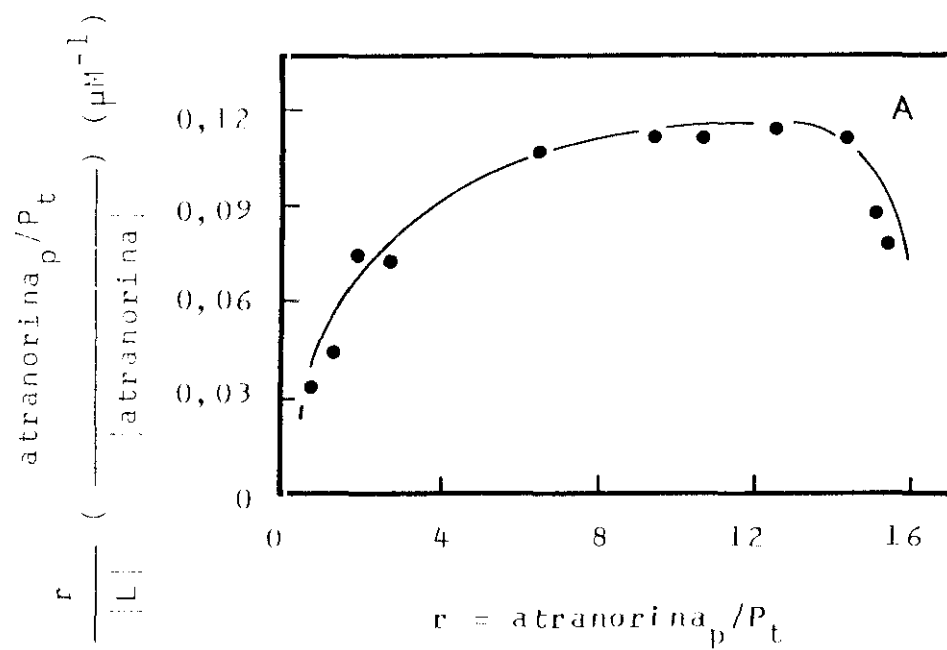


Figura 59.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

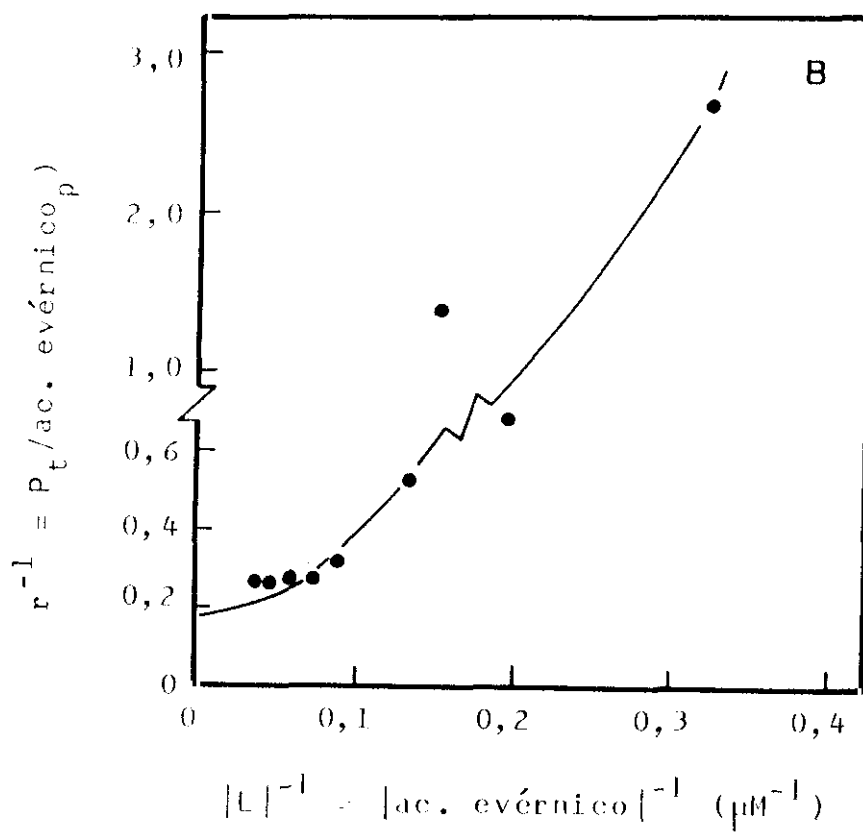
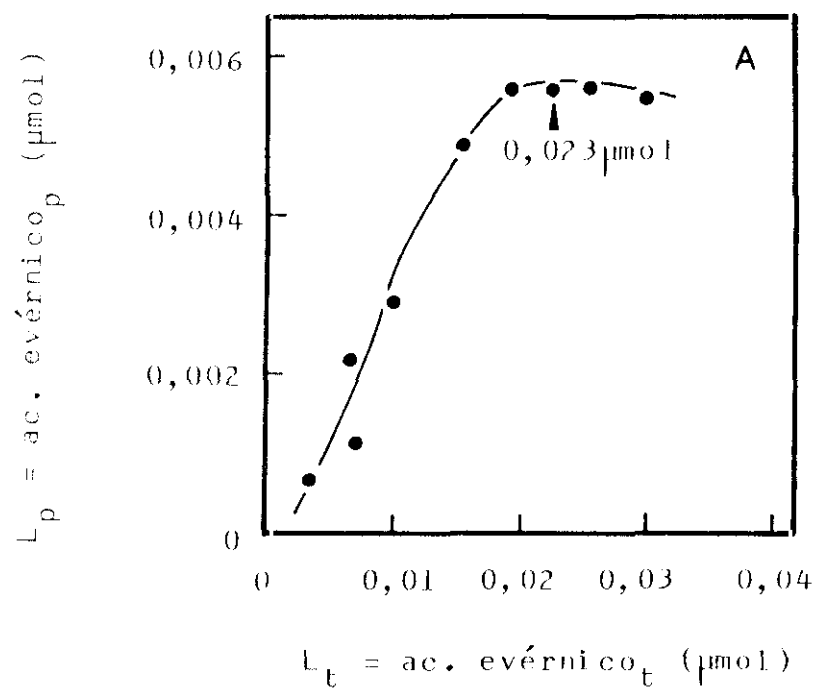


Figura 60.- Ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.

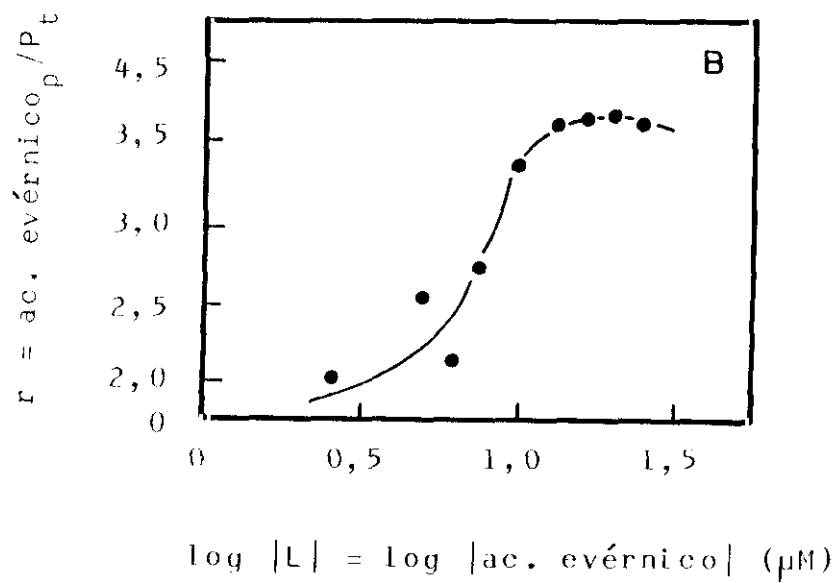
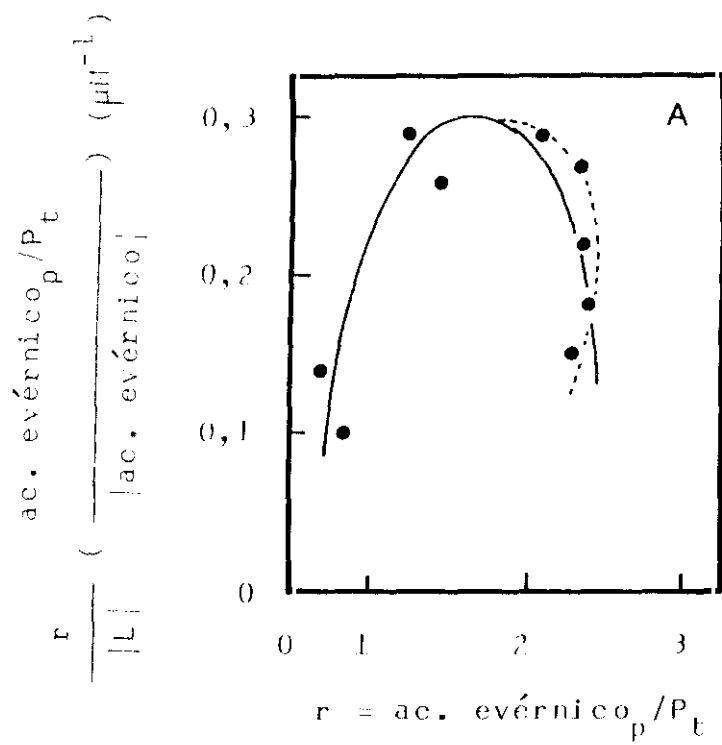


Figura 61.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación directa; en (B), representación de dobles-inversas donde el ajuste de la curva exponencial es $y = 0,03 \cdot e^{26,53 x}$; $r = 0,95$.

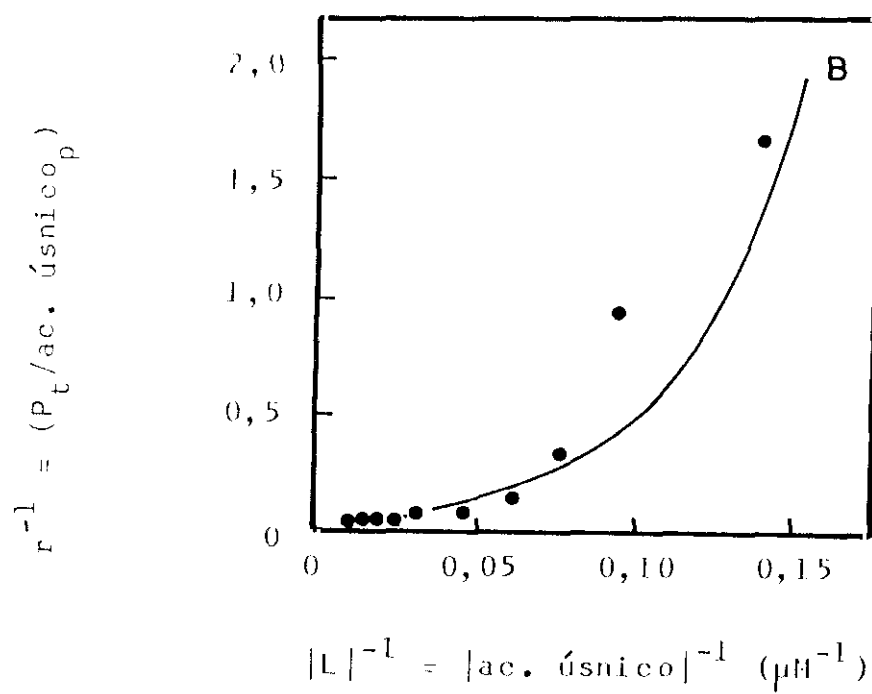
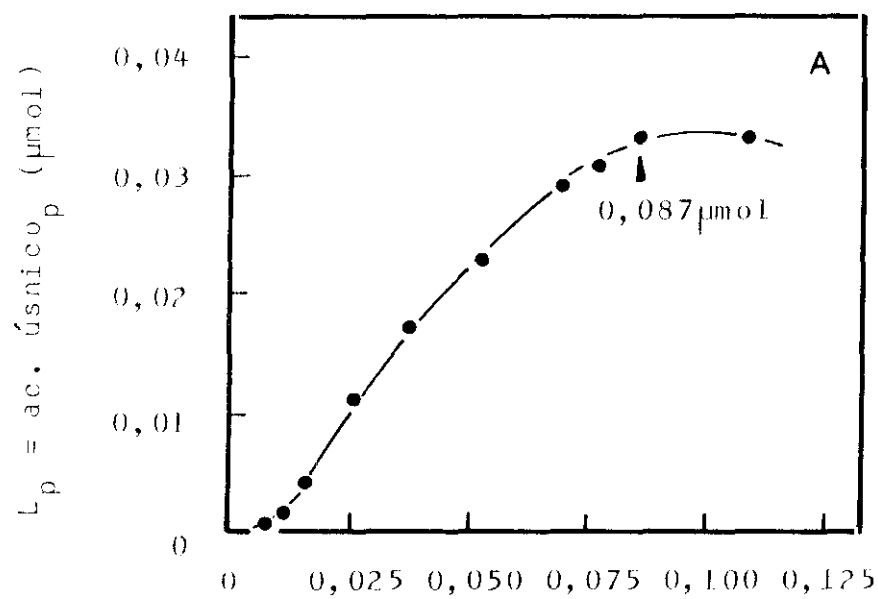
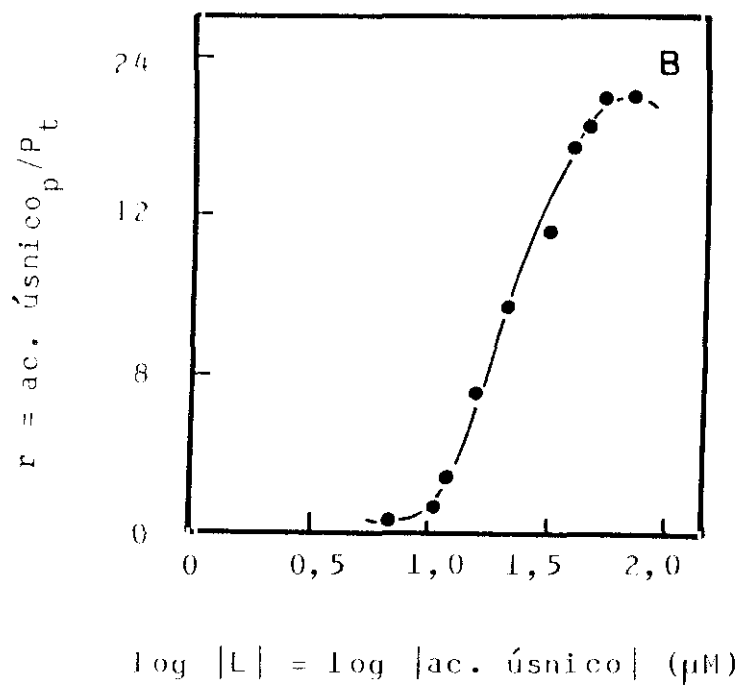
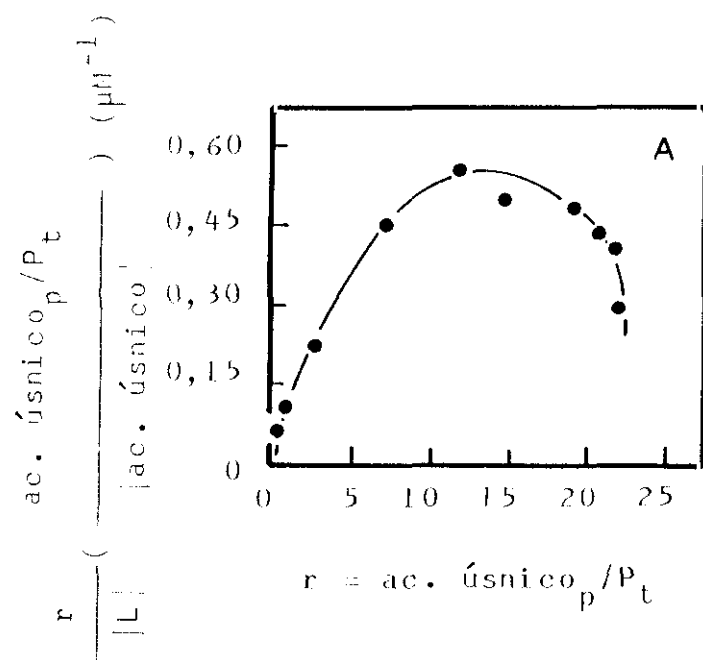


Figura 62.- Ligamiento de ácido úsnico a la isoforma IV de arginasa a una concentración 1,50 μM . En (A), representación de Scatchard; en (B), representación semi-logarítmica.



III.7.- EFECTO DEL LIGAMIENTO DE ATRANORINA, ACIDO EVERNICO Y ACIDO USNICO PRODUCIDO EN LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

En este se presentan la Figura 63 y la Tabla XVI

III.7.1.- Isoforma I

El ligamiento de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico a la isoforma I de arginasa produce agregación de la proteína nativa, según puede observarse en los resultados expuestos en la Tabla XVI. Para confeccionar esta Tabla, se eligió una de las concentraciones de efector que producía saturación de los sitios de unión en la proteína.

La atranorina 108,0 μM (0,108 μmol en la subcámara de ligando, como se deduce de la Fig. 45 A) promueve la dimerización, ya que se detecta un agregado de aproximadamente 39 kDa, el cual representa un 9,2%. De la forma nativa de la proteína, queda un 68% después del ligamiento y aparece un tercer agregado de aproximadamente 30 kDa que no se sabe a qué puede corresponder.

El ligamiento de ácido evérnico 51,0 μM (0,051 μmol en la subcámara de ligando, como se deduce de la Fig. 47 A) produce agregación de la isoforma I a dímero, trímero, tetramero y un polímero de aproximadamente 9 unidades ($M_r \simeq 160$ kDa). La forma nativa, tras la polimerización, representa el 50% de la proteína.

El ácido úsnico 87,0 μM (0,087 μmol en la subcámara de ligando, como se deduce de la Fig. 49 A) produce agregación en el 20% de la proteína nativa y aparecen dímeros, trímeros y hexámeros.

III.7.2.- Isoforma III

El ligamiento de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico a la isoforma III de arginasa produce agregación de la proteína en diferentes proporciones, según el ligando efector (Tabla XVI).

La atranorina 71,0 μM (0,071 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 51 A) agrega la proteína a dímero y trímero pero, en este caso, tras el ligamiento aparece una forma de peso molecular aproximadamente 19 kDa, inferior al peso molecular de la proteína nativa (26 kDa).

El ácido evérnico 45,0 μM (0,045 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 53 A) produce las mismas formas de agregado que la atranorina.

El ácido úsnico 77,0 μM (0,077 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 55 A) ocasiona agregación de la isoforma III de arginasa al dímero exclusivamente ($M_r \simeq 57$ kDa). Se detecta un 61% de otra forma de peso molecular inferior a la proteína nativa ($M_r \simeq 18$ kDa).

III.7.3.- Isoforma IV

Sobre la isoforma IV de arginasa, el ligamiento de atranorina 198,0 μM (0,198 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 57 A) polimeriza la proteína a dímeros y trímeros quedando, tras la unión, aproximadamente un 90% de la forma nativa.

El ácido evérnico 23,0 μM (0,023 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 59 A) produce diferentes grados de agregación: dímeros, trímeros, hexámeros y undecámeros.

El ácido úsnico 87,0 μM (0,087 μmol en la subcámara del ligando, como se deduce de la Fig. 61 A) agrega la forma nativa al dímeros, trímeros, tetrámeros y un polímero de 13 unidades ($M_r \simeq 260$ kDa) que representa aproximadamente el 3% de la proteína nativa.

La actividad arginasa de los diferentes agregados no ha sido analizada, dado el carácter microanalítico del método de HPLC-exclusión molecular empleado.

En la Figura 63 A-C se muestran tres cromatogramas representativos del efecto de agregación ocasionado en las isoformas I, III y IV nativas de arginasa, tras el ligamiento de los distintos efectores.

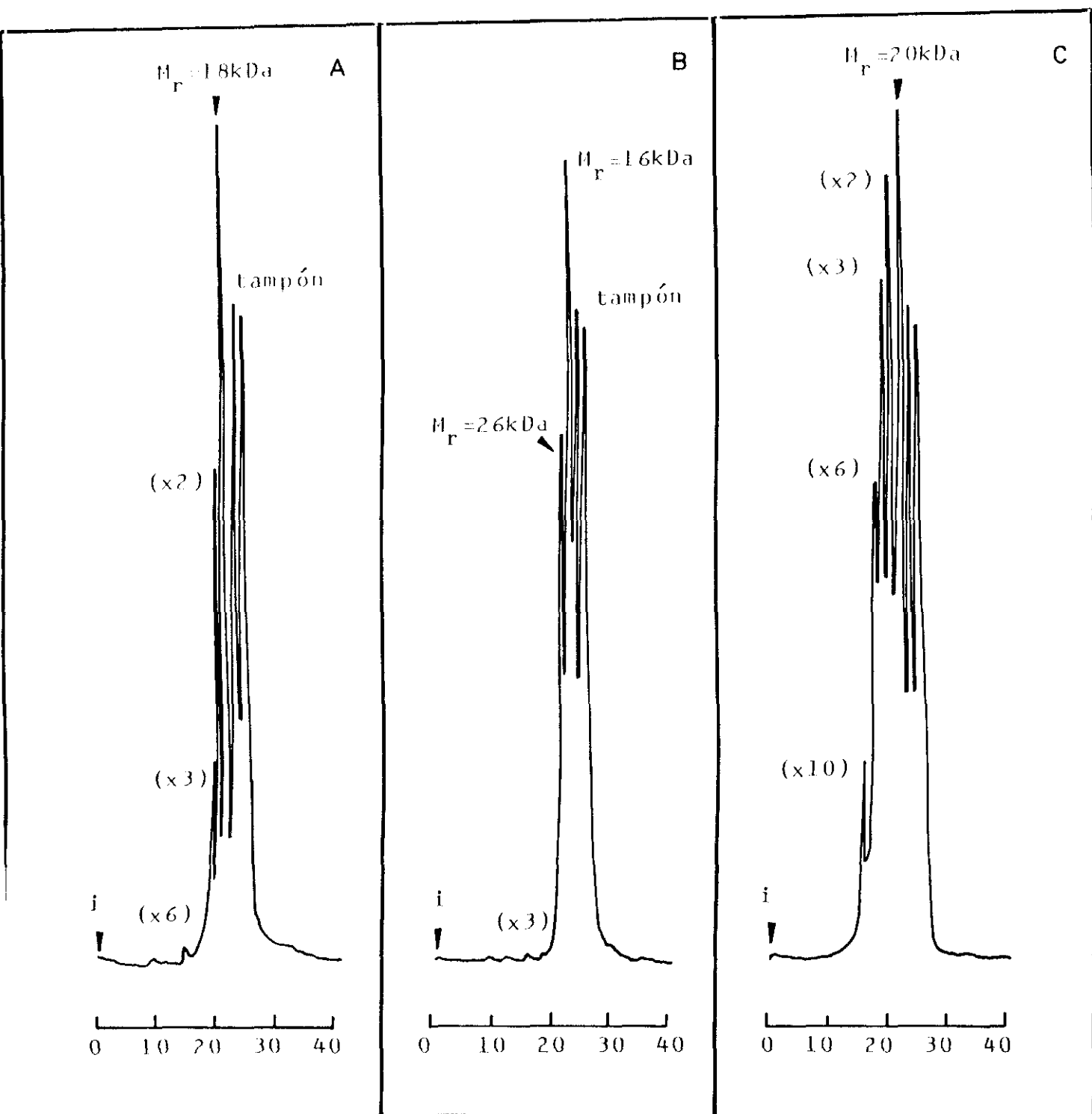
Tabla XVI.- Efecto del ligamiento de efectores sobre las isoformas de arginasa, analizado mediante HPLC de exclusión molecular.
Los detalles del experimento se citan en el apartado II.14 de Material y Métodos.

| Sobre la isoforma I de arginasa | | | | Sobre la isoforma III de arginasa | | | | Sobre la isoforma IV de arginasa | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|---------------------|---------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------|-------------|---------|-------|
| Efactor (nmol) | Forma molecular | M _r (Da) | Aparición (%) | Efactor (nmol) | Forma molecular | M _r (Da) | Aparición (%) | Efactor (nmol) | Forma molecular | M _r (Da) | Aparición (%) | | | |
| Atranorina (108,0) | nativa | 18.300** | 68,19 | Atranorina (71,0) | s.i. | 18.800 | 67,27 | Atranorina (198,0) | nativa | 20.100 | 89,58 | | | |
| | s.i* | 28.700 | 22,64 | | nativa | 26.000 | 31,04 | | dímero | 40.600 | 8,12 | | | |
| | dímero. | 38.700 | 9,17 | | dímero | 50.100 | 0,89 | | trímero | 65.300 | 2,30 | | | |
| Acido evérnico (51,0) | trímero | nativa | 18.200 | | 49,97 | Acido evérnico (45,0) | trímero | 90.500 | 0,80 | Acido evérnico (23,0) | undecámero | nativa | 20.000 | 50,12 |
| | | dímero | 36.500 | 28,86 | nativa | | | 19.000 | 6,98 | | | dímero | 41.800 | 21,53 |
| | | trímero | 55.100 | 13,91 | dímero s.i. | | | 26.100 | 19,24 | | | trímero | 60.200 | 11,85 |
| | | tetrámero | 71.400 | 7,15 | dímero | | | 40.800 | 14,83 | | | hexámero | 128.300 | 15,98 |
| | | nonámero | 159.000 | 0,11 | trímero | | | 53.600 | 54,99 | | | tridecámero | 235.900 | 0,52 |
| Acido úsnico (87,0) | hexámero | nativa | 18.000 | 80,52 | Acido úsnico (77,0) | trímero | 83.600 | 3,96 | Acido úsnico (87,0) | tridecámero | nativa | 20.000 | 31,07 | |
| | | dímero | 36.000 | 12,19 | | | s.i. | 18.400 | | | 61,37 | dímero | 42.900 | 29,16 |
| | | trímero | 48.000 | 6,55 | | | nativa | 26.000 | | | 32,27 | trímero | 65.400 | 15,43 |
| | | hexámero | 102.000 | 0,74 | | | dímero | 57.000 | | | 6,36 | tetrámero | 85.200 | 21,17 |

* s.i. = sin identificar

** La máxima desviación típica observada no excedió en valor de 700 Da en ningún caso

Figura 63.- Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular de los distintos agregados de arginasa tras el ligamiento del efector. En (A), agregados de la isoforma I en presencia de 87 nmoles de ácido úsnico; en (B), agregados de la isoforma III en presencia de 71 nmoles de atranorina y en (C), agregados de la isoforma IV en presencia de 23 nmoles de ácido evérnico. Las flechas indican el pico identificado como monómero (forma nativa).



Tiempo (min)

IV.- DISCUSSION

Los últimos pasos de la vía de la síntesis y el catabolismo de arginina en vegetales son similares a los que se producen en mamíferos y bacterias (De Ruiter y Kollöfel, 1982). Mora *et al.* (1965) propusieron una clasificación de los organismos en ureotélicos o uricotélicos, en función de la producción de urea o ácido úrico; clasificación que también adoptaron para las arginasas de dichos organismos. Sin embargo, se ha descrito actividad arginasa en plantas de soja (Kang y Cho, 1990), especie que carece del ciclo del ácido úrico. La importancia de dicha actividad en este tipo de organismos radicaría, en última instancia, en la producción de ornitina para la síntesis de poliaminas, según proponen Pohjanpelto y Hölttä, 1983).

En el presente trabajo se han descrito y caracterizado cuatro isoformas de arginasa (I,II,III y IV), si bien la isoforma I y la II son la misma, según se deduce de su similitud en el punto isoelectrico (Figs. 5 y 6), en el peso molecular (Fig. 14) y en la composición de aminoácidos (Tabla V). También se han descrito isoformas de arginasa en hígado de ratón (Herfeld y Raper, 1976; Spolaris y Bond, 1988; Tarrab *et al.*, 1974) y en *N. crassa* (Borkovich y Weis, 1987a) que difieren en sus propiedades catalíticas, moleculares e inmunológicas. Las isoformas I y IV de *E. prunastri* son inducibles por L-arginina, al igual que las arginasas de *E. coli* (Crabeel *et al.*, 1975) y *Lactobacillus lactis* (Ananyan, 1981). La isoforma III es preexistente y posiblemente se active tras la liberación de arginina vacuolizada, según describieron Martín-Falquina y Legaz (1984). También se han descrito arginasas constitutivas en *N. crassa* (Weiss y Davis, 1973, 1977) y en levaduras (Cybis y Davis, 1975).

La isoforma IV de arginasa posee un resto glicosilado compuesto de 280 residuos de glucosa, 27 de fructosa y 85 de manosa (Planelles y Legaz, 1987). La proteína es segregable al igual que la arginasa de ratón (Spolaris y Bond, 1988).

En las isoformas I, III y IV de arginasa predominan los aminoácidos ácidos (Tablas V, VIII y X). Las isoformas I y II presentan, sin embargo, ciertas diferencias a nivel de los

aminoácidos básicos y aquellos con radicales no polares. Al copurificar las dos proteínas, las diferencias encontradas podrían deberse a la microheterogeneidad obtenida al purificarlas a partir de una variada población de individuos. La isoforma IV no presenta diferencias significativas en su composición de aminoácidos respecto a la isoforma I. Ya que la isoforma IV de *E. prunastri* sólo se segrega en condiciones de inducción nutricional, probablemente se trate de la misma proteína que la isoforma I. Blanco *et al* (1984) y Pérez-Urria y Vicente (1989) también describen secreción de ureasa en *E. prunastri*. La isoforma III presenta claras diferencias en la composición aminoacídica frente a las isoformas I y IV. Posee una menor proporción de aminoácidos ácidos y de aquellos con grupos polares; sin embargo, tiene abundancia de aminoácidos con grupos no polares (Tabla VIII), lo cual indica una menor acidez de la proteína y, probablemente, una alta tendencia a la hidrofobicidad de la cadena polipeptídica. La composición de aminoácidos de las isoformas de arginasa de *E. prunastri* no guarda relación con la de otros organismos como rata, pollo o cerdo (Ikemoto, 1989).

El punto isoelectrónico, estimado mediante electroforesis capilar, de la isoforma I, alrededor de 4,9 (Fig. 10), el de la isoforma III, alrededor de 5,3 (Fig. 18) y el de la isoforma IV, alrededor de 4,8 (Fig. 23), corrobora que se trata de proteínas de carácter ácido. Wright *et al.* (1981) describieron una arginasa ácida de alcachofa con pI de 5,3, estimado mediante electroenfoque en columna. Dichos autores observaron diferencias, aunque no significativas, en la determinación del pI, ya que el valor estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida oscilaba entre 5,0 y 5,9. El pI de las isoformas de arginasa de *E. prunastri* difiere según el método empleado. Así, el valor para la isoforma I es de 5,86, estimado por electroenfoque (Fig. 5), el de la isoforma III de 6,18 (Fig. 16) y el de la isoforma IV de 5,6 (Fig. 21), valores algo diferentes a los obtenidos por electroforesis capilar. Ya que la eficiencia del sistema capilar es muy superior a la del electroenfoque en columna, en lo que se refiere a la separación de picos, el valor elegido de pI de las isoformas de arginasa es el determinado mediante electroforesis capilar. La heterogeneidad de carga también fue descrita por Spolarics y Bond (1988) en dos subunidades de arginasa (una de 35 kDa y otra de 38 kDa) de hígado de ratón. Ambas subunidades contenían proteínas básicas (rango de pI 7,8-9,1) y proteínas ácidas (rango de pI 5,8-6,4) cuya multiplicidad de carga

constituía una variante de la misma proteína.

El significado de haber detectado tres isoformas de arginasa con distinta carga podría llevar a pensar en su distinta interacción con la membrana celular o con otras enzimas, incluso con la función de la enzima en diferentes rutas metabólicas. En *E. prunastri*, la enzima proporciona ornitina y urea. Estos intermediarios, a su vez, conducen a rutas (biosíntesis de poliaminas y ciclo de la urea, respectivamente) cuyas funciones pueden estar reguladas de forma independiente.

En otro orden de funciones, Sticher y Jones (1992) detectaron dos grupos de isoformas de α -amilasa diferenciables en su punto isoelectrónico, en capas de aleurona de cebada: las isoformas de alto pI (4,90 y 4,72) y las de bajo pI (4,64 y 4,56). Las cuatro isoformas tenían diferente localización subcelular y, a su vez, las de pI 4,72 y 4,56 eran formas segregables al medio de incubación. En *E. prunastri*, la isoforma IV de arginasa, segregable al medio, también tiene un pI ligeramente inferior (5,6 ó 4,8, según la técnica utilizada) que la isoforma I (pI=5,86 ó 4,9).

Los espectros de absorción ultravioleta de las tres isoformas presentan un máximo a 275-278 nm (fig. 25), es decir, ligeramente desplazado hacia longitudes de onda inferiores al máximo de absorción del Trp libre (280 nm) (Campbell y Dwek, 1984). Esto indica la existencia de Tyr en la cadena polipeptídica. El espectro de absorción ultravioleta de la arginasa de *S. cerevisiae* presenta un máximo a 278 nm, lo cual indica el dominio del Trp en su cadena polipeptídica (Green *et al.*, 1990), además la absorbancia decae a partir de 300 nm. Sin embargo, en el espectro de las arginasas de *E. prunastri* se puede observar una discreta absorbancia a longitudes de onda superiores a 310 nm. Este hecho refleja una tendencia a la agregación por parte de las enzimas, fenómeno descrito para otras proteínas, como por ejemplo el alérgeno principal del olivo (Lauzurica *et al.*, 1988; Wheeler *et al.*, 1987).

Los espectros de emisión de fluorescencia (Figs. 26, 27 y 28) se obtuvieron sobre la base de la fluorescencia natural de los anillos aromáticos de algunos aminoácidos. Cuando se excita con una longitud de onda de 295 nm (Fig. 27), es decir, analizando exclusivamente la contribución del Trp, se detecta un máximo alrededor de 350-352 nm. Dicho máximo se encuentra muy próximo al del Trp libre (350 nm) (Campbell y Dwek, 1984), lo cual indicaría que el Trp se sitúa en un entorno bastante accesible. Una situación similar se describe para los dos

residuos de Trp presentes en la albúmina bovina (Pico y Houssier, 1989). Los cambios producidos en la fluorescencia de estos Trp son utilizados por los autores para estudiar la unión de sales biliares a la albúmina; dicha unión se traduce en un "atrapamiento" de la fluorescencia. Green *et al.* (1991) observaron que la intensidad de fluorescencia de la arginasa de *S. cerevisiae*, excitando a 295 nm, incrementaba el 100% y el máximo se desplazaba de 337 a 352 nm cuando quelaban el Zn^{2+} por diálisis, en comparación con la holoenzima. En *E. prunastri*, no se ha demostrado que la arginasa posea Zn^{2+} como ión asociado, pero llama la atención el hecho de observar el pico de máxima emisión de fluorescencia a 352 nm en las tres isoformas, idéntica longitud de onda a la que emite la arginasa de levadura en ausencia de Zn^{2+} .

La excitación y emisión simultáneas, espectro sincrónico, a diferentes longitudes de onda (Fig. 29), muestra dos máximos de emisión. El principal, a 355 nm, pone de manifiesto la contribución de los Trp; el segundo máximo, centrado entre 305-307 nm, indica la presencia de Tyr. El máximo de fluorescencia del aminoácido libre es 303 nm (Campbell y Dwek, 1984). El segundo máximo está ausente en la isoforma III de arginasa, lo que indicaría que ésta presenta una accesibilidad diferente a los residuos de Tyr. Sin embargo, la isoforma III posee un máximo a 288 nm, correspondiente a la fluorescencia de la Phe. El máximo de fluorescencia del aminoácido libre es 282 nm (Campbell y Dwek, 1984). En *S. cerevisiae* el máximo de emisión a 377 nm y el de excitación a 284 nm, se encuentran alejados de los máximos del Trp, es decir, el aminoácido se encuentra en un entorno bastante hidrofóbico (Green *et al.*, 1990).

De los resultados obtenidos a partir de los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia, se desprende que las tres isoformas de arginasa presentan una alta homología.

La arginasa ha sido descrita, generalmente, como una enzima oligomérica, compuesta por un número variable de subunidades, entre tres y ocho, en función del organismo del que se aísle. Así, la arginasa de hígado de rata se describió como un trímero o un tetramero (Aguirre y Kashe, 1983; Garganta y Bond, 1986; Hirhs-Kolb y Greenberg, 1968). La arginasa de *S. cerevisiae* es un trímero (Green *et al.*, 1990) y la de soja un tetramero (Kang y Cho, 1990). Sin embargo, la arginasa de *N. crassa* y la de *Bacillus licheniformis* presentan un mayor número de subunidades, 7 y 8, respectivamente (Borkovich y Weiss, 1987b). Por otra parte, la subunidad monomérica

tiene un peso molecular, determinado por electroforesis en SDS, que oscila entre 33 kDa, la de *B. licheniformis*, y 55 kDa, la de soja.

El peso molecular de las distintas isoformas de arginasa de *E. prunastri* fue calculado mediante HPLC en columnas de exclusión molecular, técnica que permite obtener una eficacia media por pico de $\simeq 100.000$ platos teóricos (Tabla VI). Las isoformas I y II tienen un peso molecular de 18 kDa y 16 kDa, respectivamente, la isoforma III de 26 kDa y la isoforma IV de arginasa de 20 kDa (Figs. 14, 19 y 24), valores inferiores a los descritos para otras arginasas. El análisis en presencia de SDS (Fig. 13) demostró que se trata de formas monoméricas; no se detectaron oligómeros en ningún caso. Los pesos moleculares, calculados mediante exclusión molecular en Sephadex G200, de estas mismas arginasas fueron 180 kDa para la isoforma I (Legaz y Vicente, 1980); 330 kDa para la isoforma III (Martín-Falquina y Legaz, 1984) y 245 kDa para la isoforma IV (Planelles y Legaz, 1987); es decir, se trataría, al menos, de decámeros según el valor de peso molecular del monómero estimado por HPLC.

Esta discrepancia en los valores de peso molecular, calculados por distintas técnicas, podría explicarse si existiera autoasociación de las moléculas de arginasa durante el proceso de filtración en Sephadex, fenómeno semejante al descrito por Ikemoto *et al.* (1990). Dichos autores purificaron arginasa, de hígado y eritrocito humano, con un valor de peso molecular aproximado de 100 kDa; sin embargo, cuando expresaban la arginasa de hígado humano en *E. coli*, el peso molecular que obtenían de la proteína purificada era de 35 kDa, es decir, el monómero. Ikemoto *et al.* (1990) concluyeron que la arginasa nativa era un monómero y el aparente polimorfismo de las moléculas de arginasa podría estar causado por autoasociación o incluso modificación proteolítica durante el proceso de purificación. Este fenómeno también fue observado por Totani (1973) al purificar la arginasa de hígado de cerdo.

Las isoformas I y IV de arginasa no sólo poseen una composición de aminoácidos muy semejante e igual valor de pI (4,9 y 4,8) sino también un peso molecular muy semejante (18 kDa la isoforma I y 20 kDa la isoforma IV) (Figs. 14 y 24). La diferencia de 2 kDa de peso molecular se debe al resto glicosídico, el cual representa el 10% del peso de la proteína. La composición de este residuo, determinada por Planelles y Legaz (1987), es de 280 restos de glucosa, 27 de

fructosa y 85 de manosa. El resto glicosídico de las proteínas segregables oscila entre el 5 y el 40% del peso de la glicoproteína, según proponen Goochee y Monica (1990), y puede tener implicaciones en su actividad biológica específica (actividad por gramo de glicoproteína). En *E. prunastri*, ambas isoformas son activas, pero la forma segregable es unas 3 veces menos afin por su sustrato que la isoforma I de arginasa (Tabla XIII). Este fenómeno de pérdida de actividad es bien conocido en las hormonas glicoproteicas como, por ejemplo, la tirotropina, donde la completa desglicosilación supone una pérdida de actividad (Baenziger y Green, 1988; Sairam, 1989).

La isoforma III de arginasa es de mayor tamaño que la I y la IV (26 kDa) y rica en aminoácidos característicos de pre-proteínas. Existen varias explicaciones posibles a esta heterogeneidad. En primer lugar, las diferencias de peso molecular entre dos isoformas pueden ser la consecuencia de una proteólisis post-traducciona, hecho que viene avalado por los altos niveles de Met detectados (unas dos veces superiores en la isoforma III respecto a la I). Sticher y Jones (1992) también definieron modificaciones post-traduccionales que afectaban a la carga de diferentes isoformas de α -amilasa. Al igual que ocurre con la pérdida de actividad biológica debido a la desglicosilación, una diferencia de 8 kDa en el peso molecular repercute a nivel de la K_m , haciendo 3 veces menos afin por la L-arginina a la isoforma III que a la I. Este significado regulador de la arginasa *in vivo*, consecuencia de las variaciones de tamaño, ha sido descrito por Messenguy y Dubois (1983) en las arginasas de levaduras. Aguirre y Kasche (1983) encontraron diferencias de 5 kDa entre subunidades de arginasa de hígado de rata; la proteólisis *in vitro* de la proteína demostró que este fragmento no era esencial para la actividad enzimática. Resultados similares encontraron Spolaricks y Bond (1988) en las arginasas de ratón y Cronin y Tipton (1985) en la fosfofrutoquinasa de *Trypanosoma brucei brucei*. Burkovich y Weiss (1987b) detectaron dos formas de arginasa, de 36 y 41 kDa, respectivamente, en *N. crassa*. Los estudios de transcripción *in vitro* indicaron que ambas formas procedían de mRNA_s diferentes. Dichos autores apuntaban la posible existencia de promotores alternativos para la transcripción, de tal manera que el *pool* de arginina permitiera una mayor expresión de uno de los promotores. Este fenómeno también ocurre en la invertasa de levaduras (Perlman *et al.*, 1984) y en la glutamina

sinetasa de *E. coli* (Reitzer y Magasanik, 1985).

Los valores de K_m y v_{max} resultan muy útiles cuando se trata de comparar diferentes isoformas. La determinación de estos parámetros se puede realizar mediante diferentes representaciones gráficas, sin olvidar que la interpretación de estos valores debe ser independiente del método por el cual se calculen dichos parámetros. La representación directa de los datos parece ser el mejor sistema para calcular K_m y v_{max} (Henderson, 1992). En este mismo grupo entra la representación de Eisenthal-Cornish-Bowden, pues emplea los pares $(v_0, [S_0])$, obtenidos directamente. Asumiendo siempre que la medida de la concentración de sustrato tiene un error próximo o igual a "cero", los posibles errores experimentales se introducen en la valoración de la velocidad de reacción. La representación de Lineweaver-Burk, aún siendo la más utilizada, produce errores importantes en la determinación de parámetros cinéticos, debido principalmente a la desviación de la linealidad, consecuencia de las transformaciones matemáticas de los datos. En la representación de Eadie-Hofstee también se pueden encontrar desviaciones de la linealidad interpretadas, en muchos casos erróneamente, como cooperatividad de la enzima por su sustrato. En el caso que nos ocupa, no se ha elegido ni la representación de Lineweaver-Burk ni la de Eadie-Hofstee por las razones expuestas anteriormente, máxime cuando la isoforma III de arginasa exhibe cooperatividad en la unión de L-arginina (Fig.40).

Las isoformas I y IV de arginasa son enzimas micaelianas (Figs. 37 y 42). El valor de K_m de la isoforma I es 1,5 mM y el de la isoforma IV de 4,45 mM; ambos obtenidos a partir de la representación directa. Esto indica que la isoforma I es tres veces más afín por su sustrato que la isoforma IV. Sin embargo, al comparar los valores de K_m obtenidos mediante la representación de Eisenthal-Cornish-Bowden (Figs. 38 y 43), 4,9 mM para la isoforma I y 4,0 mM para la isoforma IV, el razonamiento anterior no sería válido. En este caso, el valor de 4,9 mM, calculado para la isoforma I, es muy alto debido a que la enzima presenta una ligera inhibición por exceso de sustrato. Cuando esto sucede, la representación de Eisenthal-Cornish-Bowden no resulta conveniente (Henderson, 1992).

En el presente trabajo se optó por una tercera representación gráfica, la de Hanes, que corrobora la credibilidad de los valores obtenidos a partir de la representación directa, ya que

ambos ejes son independientes. El valor de K_m de la isoforma I de arginasa, obtenido a partir de esta representación es de 1,25 mM (Fig. 39) y el de la isoforma IV de 3,0 mM (Fig. 44). Dichos valores confirman lo propuesto anteriormente: la isoforma I es aproximadamente tres veces más afin por la arginina que la isoforma IV. Arginasas purificadas a partir de otros organismos tienen valores de K_m algo superiores. Es el caso de la proteína de *S. cerevisiae* ($K_m = 15,7$ mM) (Kang y Cho, 1990), la de alcachofa (K_m entre 8,0 y 18 mM) (Wright *et al.*, 1981) y la arginasa de hígado de rata (K_m entre 1,7 y 18 mM) (Garganta y Bond, 1986).

Aún siendo menor el valor de K_m de la isoforma I que el de la IV, la velocidad máxima de ésta última es mayor (Tabla XIII).

La isoforma III de arginasa, a diferencia de la I y la IV, exhibe una cinética sigmoidal, típica de enzimas alostéricas (Fig. 40), lo cual implica la existencia de cooperatividad positiva en la unión de su sustrato. Este resultado se confirma al comparar el valor del coeficiente de Hill (h) $\simeq 4$ (Fig. 41 y Tabla XIV).

La arginasa de hígado de rata muestra diferentes cinéticas en función no sólo de la concentración de sustrato (arginina), sino de cofactor (Mn^{2+}). A concentraciones de arginina alrededor de 1 mM, tanto en presencia como en ausencia de Mn^{2+} 30 μM , la enzima exhibe cinética micaliana, pero su K_m varía de 0,94 mM (en presencia de Mn^{2+}) a 1,58 mM (en ausencia de Mn^{2+}). Sin embargo, en el rango de concentración entre 5 y 35 μM de arginina, la arginina pasa de ser micaliana, con valor de $K_m = 14,4$ μM (en ausencia de Mn^{2+}), a alostérica, con $S_{0,5} = 6,5$ μM y un coeficiente de Hill = 2, lo que demuestra su cooperatividad en la unión del sustrato (Maggini *et al.*, 1992). Es posible que la isoforma III de arginasa exhibiera diferente cinética variando la concentración de Mn^{2+} , aunque esta conducta no ha sido comprobada, ya que la concentración de cofactor utilizada ha sido la misma en todos los casos.

Carvajal *et al.* (1982) refirieron cambios de cinéticas hiperbólicas a sigmoidales producidas por diferentes grados de asociación de las subunidades de arginasa de hígado humano en función del pH. La arginasa constitutiva de *E. prunastri*, aislada y purificada por Martín-Falquina y Legaz (1984) no mostraba cooperatividad en la unión sustrato, posiblemente debido a un grado de asociación de las subunidades distinto al encontrado en el presente trabajo, como

podría sospecharse de su elevado peso molecular, estimado en 330 kDa. También es posible que se trate de una "falsa cooperatividad". Tipton (1992) define como "falsa cooperatividad" la reflejada como consecuencia de la lenta asociación-disociación de varias subunidades de una enzima. Este fenómeno también ha sido observado en la GTP ciclohidrolasa I de hígado de rata (Hatakeyama *et al.* 1989). Por otra parte, la riqueza en aminoácidos no polares de la isoforma III de arginasa (Tabla VIII), permitiría la formación de un núcleo hidrofóbico, base para dicha asociación. El valor de $S_{0.5}$ (concentración de sustrato que produce el 50% de la velocidad máxima) es 4,5 mM (Tabla XIII), lo que indicaría que la enzima es cuatro veces menos afin por L-arginina que la isoforma I. En este caso, además, el valor de $v_{\max} = 2,12 \mu\text{moles de amonio} \cdot \text{min}^{-1}$ es el menor obtenido en comparación con las otras isoformas.

Una conclusión generalizada sobre cinéticas sigmoidales, asume que el alosterismo se produce en enzimas oligoméricas (Price y Stevens, 1986), pero este no es el caso. También puede ocurrir en proteínas con varios sitios de unión para el sustrato (Merkler y Schramm, 1990). Se han descrito cinéticas alostéricas debidas a interacciones proteína-proteína que conllevan cambios en la estructura terciaria y cuaternaria; es el caso descrito para la asociación del inhibidor de la subtilisina a la subtilisina o de la arginina a la ornitina carbamil transferasa (Janin y Chothia, 1990). Esta última posibilidad queda descartada al tratarse de isoformas purificadas como monómeros.

Otra diferencia significativa entre las tres isoformas de arginasa es la regulación que sobre ellas ejercen los fenoles atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico. Antes de comentar estos efectos se deben matizar una serie de detalles.

En primer lugar, comentar que la determinación de los fenoles, en general, no resulta problemática, siempre y cuando tengan una alta solubilidad en agua. Es el caso del resorcinol o el catecol. Risner y Cash (1990) extrajeron compuestos fenólicos, a partir de muestras de humo de cigarrillo, utilizando disoluciones acuosas de ácido acético al 1% (v/v). Guisse y Bertru (1987) propusieron un sistema de extracción que consiste en ácido acético y óxido de éter, lo que suponía una ventaja sobre el anterior. En ambos casos se empleaba una columna de fase reversa en HPLC, detectando los compuestos a 280 nm ó 254 nm. Ambos métodos son más rápidos y la

sensibilidad obtenida mayor que en los descritos por Coutis *et al.* (1979) y Nanni *et al.* (1988), utilizando cromatografía de gases.

Los fenoles de *E. prunastri* tienen muy baja solubilidad en agua, por lo que el empleo de fases acuosas en su extracción no resulta adecuado. El método de extracción que se describe en el presente trabajo tiene grandes ventajas sobre otros utilizados hasta el momento. En primer lugar, se propone una mezcla de fases orgánicas extractivas que tiene en cuenta la naturaleza y propiedades químicas de las funciones presentes en los fenoles liquénicos. La mezcla de cloroformo/ acetonitrilo/ éter dietílico/ acetato de etilo, recupera hasta el 99% de los fenoles contenidos en muestras acuosas (Fig. 2). En segundo lugar, la elución isocrática de la fase móvil es menos compleja y más rápida en comparación con las eluciones en gradiente como, por ejemplo, la sugerida por Murphy y Brad-Stutte (1983) en el análisis de los ácidos benzoico y cinámico. En tercer lugar, debe resaltarse la ventaja que supone la detección de cada sustancia a la longitud de onda de su máxima absorción. En la detección de los fenoles de *E. prunastri* se ha empleado un cambio de longitud de onda temporal en función del tiempo de retención de los compuestos. La detección de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico a 254 nm de longitud de onda fija fija (Legaz y Vicente, 1983), puede llevar a resultados equivocados, debido a la menor absorbancia que presentan estos compuestos respecto a otras longitudes de onda. Strack *et al.* (1979) también detectaron fenoles de diferente naturaleza a 254 nm.

La sensibilidad del método de detección propuesto permite cuantificar fenoles en el rango de nmoles, resultado éste que sólo se obtenía utilizando complejos protocolos de derivatización y posterior detección fluorimétrica (Ogan y Katz, 1981).

El fraccionamiento del talo que se propone, permite observar la localización mayoritaria de cada uno de los fenoles. Los talos incubados en arginina retienen principalmente atranorina y ácido úsnico, siendo el ácido evérnico el que se segrega al medio en mayor proporción. Una primera aproximación sería suponer que la atranorina y el ácido úsnico fueran los fenoles responsables de la regulación de la actividad de la isoforma I, mientras que el ácido evérnico sería el responsable de la regulación de la isoforma IV. Sin embargo, la cantidad de fenol solubilizado en el extracto libre de células y el medio de incubación difiere de la detectada en talo, esta

cantidad es del orden de un millón de veces inferior. Por tanto, la idea anterior de regulación de la actividad de las isoformas de arginasa en función de la cantidad de fenol detectada en talo o en medio no es válida, debiéndose estudiar el efecto regulador en función de la cantidad de efector accesible a la enzima. La mayor cantidad de fenoles solubilizados se detecta en el medio de incubación, por lo que sería la isoforma IV de arginasa la regulable por mayores concentraciones de efector (Tabla XII). No hay contradicción entre este resultado y la baja solubilidad de los fenoles en agua, ya que valores alcalinos de pH incrementan su solubilidad, así como la formación de quelatos (Rundel, 1978).

La baja cantidad de fenoles encontrada en los extractos libres de células se debe a que éstos cristalizan en los espacios intercelulares sobre las paredes del alga (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Avalos y Vicente, 1987; Honegger, 1986; Legaz y Vicente, 1989). Estos fenoles, junto con los depositados en el córtex (Fig. 35 A-C) no tendrían efecto regulador significativo sobre las isoformas de arginasa, ya que no están solubilizados.

El patrón de distribución de los fenoles en talos incubados en cicloheximida (Fig. 36 A-C) es muy diferente al anterior. Los fenoles que se detectan en mayor cantidad son los ácidos evérnico y úsnico, siendo éstos, a su vez, los que se solubilizan en mayor medida en el extracto libre de células (Tabla XII).

Los fenoles están descritos como potentes reguladores de varias actividades enzimáticas. Aunque habitualmente se describen como inhibidores (Planas *et al.*, 1981; Ravise *et al.*, 1980), algunas veces se comportan como activadores. Este fenómeno se ha descrito para la actividad lacasa de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* (Giovannozzi-Sernanni y Luna, 1981). La activación o inactivación, en general, depende de la concentración de efector utilizada. Así, la arginasa inducible purificada por Legaz y Vicente (1982) es activada por atranorina a concentraciones comprendidas entre 1 y 8 μM , pero resulta completamente inhibida a concentraciones superiores a 12 μM . El ácido evérnico inactiva totalmente a la enzima a concentraciones superiores a 16 μM (Legaz y Vicente, 1983).

La isoforma I de arginasa, asimilable a la enzima inducible de Legaz y Vicente (1982), es activada por atranorina 33,3 nM, fenol que se comporta como un activador no competitivo, es

decir, no compite con el sustrato por el centro activo de la proteína. El ácido evérnico 130 nM es un activador mixto de la isoforma I, mientras que el ácido úsnico 173,3 nM se comporta como un inhibidor competitivo. Puede entonces afirmarse que, en general, bajas concentraciones de fenoles producen activación, mientras que las altas concentraciones ocasionan el efecto contrario.

La isoforma III de arginasa es inhibida por los tres fenoles a concentraciones que oscilan entre 0,10 y 0,47 μM (Fig. 40). La arginasa pre-existente, descrita por Martín-Falquina y Legaz (1984), asimilable a la isoforma III, resultaba activada por mezclas de fenoles a concentraciones superiores a 6 μM de atranorina, 19 μM de ácido evérnico y 200 μM de ácido úsnico.

Los ácido evérnico (1,15 mM) y úsnico (1,27 mM) se comportan como inhibidores no competitivos de la isoforma IV de arginasa, mientras que la atranorina 1,69 mM es un activador mixto. La arginasa segregable, descrita por Planelles y Legaz (1987), asimilable a la isoforma IV, era activada por ácido úsnico en el rango de concentraciones comprendidas entre 20 y 120 μM , diez veces inferiores a las ensayadas en el presente estudio.

No obstante, la concentración de fenol solubilizada en el extracto libre de células y por tanto accesible, en principio, a la enzima, va a depender del pH del medio en cada momento (Legaz *et al.*, 1993b), por lo que siempre es conveniente cuantificar el fenol, previo al ensayo de efeccción *in vitro*. Otra gran variación que puede observarse en la cantidad de fenoles es la debida a las condiciones ambientales (Legaz *et al.*, 1986), las cuales a su vez varían dependiendo no sólo de la estación del año sino de otros muchísimos factores como pluviosidad, densidad de flujo fotónico, temperatura, etc..

Los estudios de ligamiento contribuyen en gran medida al conocimiento de las interacciones entre una proteína y sus efectores. Los resultados obtenidos se presentan habitualmente como cinéticas de Scatchard (1949), a partir de las cuales se establece el número de sitios de unión para el efector y sus características. Sin embargo, es muy difícil obtener estas conclusiones a partir de una sola representación gráfica (Pedersen *et al.*, 1986; Klotz, 1989; Munson y Rodbard, 1980). Por ello, en el estudio que se presenta, se han elegido otras tres representaciones gráficas: la directa de ligamiento, la de dobles-inversas y la semi-logarítmica (Tabla III).

Las representaciones directas de los datos del ligamiento de atranorina, ácido evérnico y ácido úsnico a cada una de las isoformas de arginasa muestran, aún siendo cinéticas hiperbólicas, una cierta tendencia a la sigmoicidad (Figs. 45, 47, 51, 53, 57, 59 y 61), a excepción del ligamiento del ácido úsnico a las isoformas I y III (Figs. 49 y 55, respectivamente) claramente hiperbólicas. Price y Dwek (1982) proponen la existencia de cooperatividad positiva como explicación a estos perfiles de la gráfica de saturación.

También puede observarse que el nivel de saturación de sitios en la proteína es diferente según la isoforma de la que se trate. Así, las isoformas I y IV necesitan mayor cantidad de atranorina (aproximadamente el doble) que la isoforma III para lograr la saturación (Figs. 45 A, 51 A y 57 A). El comportamiento de las proteínas frente al ácido evérnico es muy diferente. La isoforma IV satura sus sitios de unión para el efector a menor cantidad de ligando (entre 3 y 5 veces menos) que las isoformas I y III (Figs. 47 A, 53 A y 59 A). Por el contrario, la saturación del número de sitios para el ácido úsnico (Figs. 49 A, 55 A y 61 A) se produce a cantidades de ligando casi dos veces superiores en la isoforma III que en las isoformas I y IV. La principal diferencia entre las isoformas I y IV respecto a la III estriba en que las primeras necesitan mayor cantidad de atranorina que de otros efectores para saturar sus sitios, mientras que la isoforma III requiere mayor cantidad de úsnico que de otros efectores para alcanzar la saturación.

Los datos del ligamiento utilizados en la representación de dobles-inversas se ajustan, en todos los casos, a una curva exponencial (Figs. 45 B, 47 B, 49 B, 51 B, 53 B, 55 B, 57 B, 59 B y 61 B), hecho que indica la existencia de un claro patrón de cooperatividad positiva para la unión de los tres fenoles a las tres isoformas de arginasa, según propone Neet (1980). Este tipo de representación permite realizar una primera aproximación al número de sitios de ligamiento (n) para el efector por molécula de proteína, como definieron Klotz y Hunston (1971).

| ISOFORMA DE ARGINASA | NUMERO DE SITIOS DE UNION PARA EL EFECTOR POR MOLECULA DE PROTEINA | | |
|-------------------------|---|--------------|------------|
| | EFECTOR | | |
| | ATRANORINA | AC. EVERNICO | AC. USNICO |
| I | 4 | 4 | 10* |
| III | 26 | 8 | 26 |
| IV | 23 | 5 | 32 |

*Valores superiores a 10 indican inespecificidad en el ligamiento (Klotz, 1989)

La isoforma I es la que liga los efectores con una mayor especificidad, sólo posee 4 sitios de unión para la atranorina y otros 4 para el ácido evérnico por molécula de proteína. La semejanza entre la isoforma I y la IV radica en su especificidad para ligar ácido evérnico, pero la diferencia entre ambas proteínas estriba en que la isoforma IV pierde la especificidad en el ligamiento de atranorina y ácido úsnico. La isoforma III presenta una mayor semejanza con la isoforma IV que con la I, ya que III Y IV ligan ácido evérnico de forma específica, pero atranorina y ácido úsnico de manera inespecífica.

No obstante, Klotz (1989) apunta la posibilidad de obtener conclusiones erróneas a partir de la representación de dobles-inversas de los datos de ligamiento, debido a la fuerte compresión que sufren éstos en las proximidades del eje de ordenadas. El propone determinar el número de sitios de unión a partir de la representación semi-logarítmica. Nosotros estamos de acuerdo con Klotz (1989), ya que en este tipo de representación se obtienen dos claras ventajas. En primer lugar, existe un espaciado uniforme de los datos y , en segundo lugar, se puede observar una plataforma de saturación inequívoca a partir de la cual se puede calcular el número de sitios de ligamiento.

Los valores que se obtienen mediante esta representación (Figs. 46 B, 48 B, 50 B, 52 B, 54 B, 56 B, 58 B, 60 B y 62 B) son prácticamente iguales a los obtenidos mediante la representación de dobles-inversas. La única variación en el número de sitios es la obtenida en el ligamiento de atranorina a las isoformas III y IV (Figs. 52 y 58). Donde antes aparecían 26 y 23 sitios, respectivamente, ahora son aproximadamente 13 y 15 los sitios de unión para el ligando. En cualquier caso, un valor superior a 10 sitios lo único que indica es una alta inespecificidad de

ligamiento proteína-efector. No obstante, esta diferencia de valores podría deberse a que la enzima se está saturando en realidad a niveles inferiores de ligando a los que indica la representación directa, según propone Pedersen *et al.* (1986). Honoré y Brodersen (1983) determinaron 11 sitios de unión para el diflunisal (fármaco antiinflamatorio) a la albúmina, no logrando saturar la proteína a los niveles de fármaco utilizados, por lo que el número de sitios propuesto resultó ser erróneo. En nuestro caso esto no sucede, ya que siempre se obtiene una curva de saturación previa.

La literatura muestra la representación de Scatchard como la habitual en el estudio del ligamiento. Cuando la representación proporciona una línea recta, esto se interpreta como la unión de un ligando homogéneo a sitios idénticos e independientes. Sin embargo, existen cinéticas de ligamiento donde los datos se alejan de la linearidad. En las tres isoformas de arginasa se observa este comportamiento para el ligamiento de cualquier efector (Figs. 46 A, 48 A, 52 A, 54 A, 56 A, 58 A, 60 A y 62 A), donde los datos se pueden ajustar a curvas cóncavo-convexas, excepto la que muestra la unión del ácido úsnico a la isoforma I (Fig. 50). Este tipo de curvas se considera indicativo de cooperatividad positiva en la unión del ligando a la proteína (Price y Stevens, 1986). Es decir, se puede concluir que existen interacciones entre los diferentes sitios de tal manera que la afinidad de cada sitio cambia con la ocupación de los otros y en estas condiciones se podría determinar más de una constante de ligamiento para cada uno de los sitios (Klotz y Hunston, 1977).

La cooperatividad positiva se puede mimetizar por varios artefactos, como por ejemplo es la heterogeneidad del ligando. Mendel *et al.* (1985) observaron este efecto en el ligamiento de receptores de superficie celular a lipoproteínas. El efecto se debía a que las lipoproteínas se aíslan generalmente como mezclas heterogéneas de partículas de varios tamaños y características. De acuerdo con los mismos autores se debe entender como ligando heterogéneo a una mezcla de ligandos que tienen distinta afinidad por el receptor (proteína) o bien un ligando con impurezas químicas. En el caso que nos ocupa, la existencia de cooperatividad positiva definida en el ligamiento de atranorina y ácidos evérnico y úsnico a las isoformas de arginasa no está mimetizada por el empleo de ligandos heterogéneos. Se han utilizado fenoles (ligandos)

comerciales de pureza $\approx 99,8\%$, comprobada mediante análisis en HPLC utilizando columnas de fase reversa. Otro artefacto que puede mimetizar la cooperatividad positiva es la autoasociación del ligando (Ishida *et al.*, 1988). Esta posibilidad puede ser descartada si el tiempo requerido por los fenoles para alcanzar el equilibrio de diálisis en presencia o ausencia de la proteína no difiere en más de 2 h (Pedersen *et al.*, 1986), lo cual se satisface en nuestro caso.

Otra posible explicación de los resultados obtenidos en las representaciones de Scatchard estaría relacionada con los cambios en el peso molecular de las isoformas, debidos a la reacción asociación-disociación de las proteínas en presencia del fenol. Diversos autores (Ainslie *et al.*, 1972; O'Fagain *et al.*, 1982) hablan de una "cinética transitoria lenta" para apoyar la cooperatividad mostrada en el ligamiento de efectores a enzimas monoméricas, caso de las isoformas I, III y IV de arginasa. Esta cinética consistiría en una reacción de isomerización o bien en una asociación-disociación de la proteína. Un mecanismo de este tipo fue descrito para la glutamato deshidrogenasa (Frieden y Colman, 1967). En un principio, estos autores establecieron una correlación entre los cambios de peso molecular de la enzima y la activación o inhibición por nucleótidos de purina (GTP y GDP), de tal manera que el polímero era activo y el monómero era relativamente inactivo. Sin embargo, los resultados cinéticos y de ligamiento, les permitieron concluir que el GTP y el GDP se unían menos a la forma polimérica que a la monomérica. Existía una fuerte cooperatividad positiva a valores altos de concentración de proteína, pero este efecto era menor a concentraciones de proteína inferiores a $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esto se debía a que en el primer caso la concentración de proteína era mayor que la constante de disociación para el efector. La representación de Scatchard de los datos de ligamiento de atranorina a la isoforma III de arginasa (Fig 52 A) resulta especialmente discutible. Si bien los puntos se pueden aproximar a una curva cóncavo-convexa, señalábamos en el punto III.6.2.1. de Resultados que otra posibilidad sería ajustarlos a un "ciclo de histéresis". Dicho de otro modo, la isoforma III muestra una muy lenta respuesta de asociación-disociación a los cambios de concentración de atranorina. Este hecho viene avalado por el perfil de la curva semi-logarítmica (Fig. 52 B), donde se observa un descenso de la cantidad de atranorina ligada a partir de concentraciones de efector libre superiores a $1,8 \mu\text{M}$. Conviene también resaltar la consecuencia que el ligamiento de atranorina

produce en la isoforma III en comparación con los otros efectores en las distintas isoformas. Es el único caso en que sólo se observa un 2% de formas poliméricas respecto a la proteína nativa (Fig. 63). Podríamos, entonces, definir el comportamiento de la isoforma III de arginasa como histerético en su unión a la atranorina, según la definición propuesta por Neet y Ainslie (1980) para este tipo de respuestas. Un comportamiento similar ocurre en el ligamiento de ácido evérnico a la isoforma IV (Fig. 60 A) aunque, en este caso, se hace menos patente el ciclo de histéresis. La glucosidasa de caña de azúcar también se comporta como histerética en su interacción con Mn^{2+} (Legaz *et al.*, 1991).

Las isoformas I y IV de *E. prunastri* no muestran cooperatividad en la unión del sustrato, como se desprende de sus cinéticas micasianas (Figs. 37 y 42) y del coeficiente de Hill (h) (Tabla XIV). Es sólo en presencia de efectores cuando se observa la cooperatividad positiva. Teng-Leary y Kohlhaw (1973) describieron una situación similar en la α -isopropilmalato sintasa de *Salmonella typhimurium*. La enzima exhibía cooperatividad positiva para el ligamiento de Leu (retroinhibidor) pero no para el ligamiento del sustrato, lo que permitía deducir que estaba sujeta a un equilibrio de asociación-disociación determinado por el efector.

La isoforma III de arginasa muestra una clara cooperatividad para la unión del sustrato, como se puede deducir de su cinética sigmoidal (Fig. 40) y del valor del coeficiente de Hill (Tabla XIV). De los datos del ligamiento también se desprende que la isoforma III presenta cooperatividad positiva en el ligamiento de atranorina y ácidos evérnico y úsnico.

La única excepción de ligamiento con cooperatividad positiva la presenta el ácido úsnico en su unión a la isoforma I de arginasa (Fig. 50 A). La representación de dobles-inversas (Fig. 50 B) y la semi-logarítmica (Fig. 51 B) confirman una unión inespecífica al estimar en 10 el número de sitios de ligamiento; sin embargo, la cinética de Scatchard no da una curva cóncavo-convexa (Fig. 51 A). Hay dos posibles explicaciones, una sería que en la isoforma I no se produjera reacción de asociación-disociación en presencia de ácido úsnico o que todas las formas de proteína mostraran la misma afinidad por el efector. También conviene destacar que la única inhibición competitiva de cualquier isoforma es la producida por ácido úsnico sobre la isoforma I (Tabla XIII)

Se han propuesto varios modelos para explicar las cinéticas cooperativas de las enzimas. En general, todos ellos se centran en las interacciones entre subunidades de enzimas oligoméricas. Sin embargo, cuando se trata de enzimas monoméricas, como es el caso que nos ocupa, todos apuntan a la existencia de asociaciones-disociaciones de la enzima (Ainslie *et al.*, 1972; Meunier *et al.*, 1974), hecho que se confirma por las cinéticas cóncavo-convexas de la representación de Scatchard.

Ricard *et al.* (1974) proponen un nuevo concepto, el de "transición con memoria", para explicar el alejamiento del comportamiento micaeliano en algunas enzimas monoméricas. El concepto se basa en la existencia de dos formas conformacionales distintas de la enzima en equilibrio y no a un mecanismo de transición lenta como el descrito por O'Fagain *et al.* (1982). La explicación de Ricard *et al.* (1974), no obstante, no es válida para la isoforma III de arginasa, ya que su teoría implica cooperatividad a nivel cinético, pero que no se manifiesta en los estudios de ligamiento. La isoforma III muestra cooperatividad tanto a nivel cinético como en el ligamiento de efectores.

La reacción de asociación-disociación es muy importante en la regulación de la actividad enzimática, ya que cada una de las formas presenta diferente afinidad por el efector. También resulta necesario conocer qué proporción de cada una de las formas enzimáticas existe para una concentración dada de efector. Frieden y Colman (1967) estudiaron los cambios de peso molecular ocurridos en la α -isopropilmalato sintasa promovidos por el ligamiento de Leu y concluyeron que existía un claro predominio de especies diméricas frente a monómeros y tetrameros, aunque no llegaron a determinar la proporción de monómero y polímeros existente a cada concentración de efector. En nuestro caso, se ha podido calcular la proporción de formas monomérica y poliméricas, estimando los pesos moleculares de cada isoforma de arginasa tras el ligamiento del efector a diferentes concentraciones (Tabla XVI). En todos los casos, puede observarse un claro predominio de la forma nativa sobre las poliméricas, tras el ligamiento. Los tipos de agregados que suceden con mayor frecuencia son los dímeros y los trímeros, si bien el tipo de agregación es función de tres variables: isoforma de arginasa, naturaleza del efector y concentración del mismo (Tabla XVI y Fig. 63).

En términos generales, la unión de ácido evérnico a las isoformas I y III de arginasa proporciona los mayores niveles de polimerización, encontrando únicamente un 49,97 y 19,24% de las formas nativas, respectivamente. Para la isoforma IV el menor porcentaje de forma nativa aparece cuando se liga ácido úsnico a la proteína. En todos los casos, la atranorina produce los menores niveles de polimerización, así como los oligómeros de menor número de subunidades.

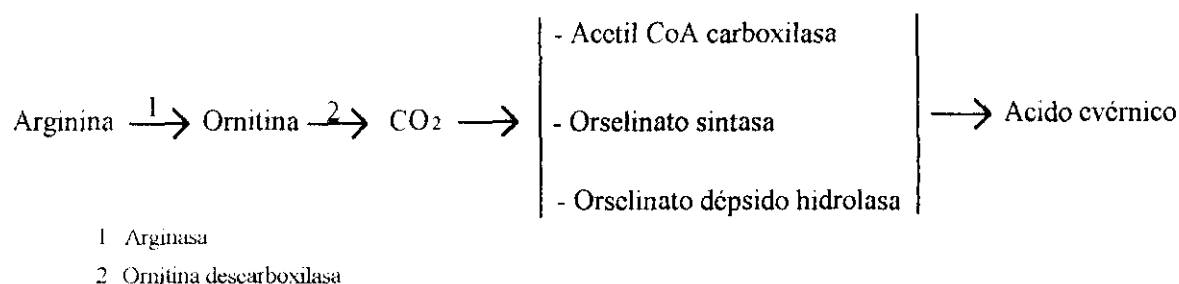
El agregado de mayor tamaño encontrado para la isoforma I corresponde a un nonámero, obtenido tras el ligamiento de ácido evérnico a esta isoforma; el oligómero representa sólo un 0,11% de la proteína total. Por otra parte, se detecta un tridecámero tras la unión de ácido úsnico a la isoforma IV, el cual representa un 3,17% de la proteína total.

La isoforma III no presenta, en ningún caso, agregados mayores que trímeros; sin embargo, no sólo se detectan polímeros, sino que también picos correspondientes a un peso molecular inferior (≈ 19 kDa) al de la forma nativa de la isoforma III. La proporción de estos picos oscila entre el 7 y el 67% de la proteína total eluida del sistema de HPLC. Además, este peso molecular es similar al estimado para la isoforma I de arginasa. Este hecho implica que, posiblemente, el auténtico monómero de arginasa en *E. prunastri* posea un peso molecular de 18 kDa. La aparición de esta forma tras el ligamiento de atranorina, ácido evérnico o ácido úsnico a la isoforma III estaría induciendo un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína, permitiendo su disociación en una forma de menor tamaño.

La proyección fisiológica que puedan tener la existencia y producción de las diferentes isoformas, previamente descritas, es de difícil evaluación. Para situar este punto de la discusión, habría que hacer las siguientes precisiones:

a) En *E. prunastri*, los sistemas de carboxilación que utilizan dióxido de carbono atmosférico producen primariamente hidratos de carbono, mientras que el producido por descarboxilaciones internas, singularmente por hidrólisis de urea, va a ser empleado en la síntesis de fenoles (Blanco *et al.*, 1984), principalmente ácido evérnico. Sobre esta base, la modulación de la actividad de arginasa se relaciona con el nivel de ácido evérnico a través de la activación de sus enzimas subsidiarias: ureasa y ornitina descarboxilasa. Hay que hacer notar que, sobre la base del número de sitios de unión del ácido evérnico, como ligando, a las diferentes isoformas de

arginasa, este fenol es el único que muestra especificidad de ligamiento, siendo activador mixto de la isoforma I e inhibidor de las isoformas III y IV. Por tanto, en una secuencia, posiblemente fúngica (Vicente y Legaz, 1992), descrita como



el fenol regularía su nivel como activador de la isoforma I o retroinhibidor de la isoforma III, primando una relación u otra según la necesidad fisiológica.

El CO₂ producido por hidrólisis de la urea es, preferentemente algal, lo cual no invalida la hipótesis de retroinhibición dado que cantidades discretas de ácido evérnico pueden encontrarse en el citoplasma del ficobionte.

b) El papel de una isoforma segregable de arginasa es dudoso. Aunque puede esperarse que un líquen epífito encuentre arginina exógena en su sustrato, es difícilmente imaginable que los fenoles puedan actuar como efectores extratalinos de arginasa. Sería más fácil considerar esta isoforma como una señal fúngica de tipo parasitario (Molina *et al.*, 1993), segregada a los espacios intercelulares como una función exclusiva del estado de rehidratación del talo (Legaz y Vicente, 1991a; Vicente, 1990). En los espacios intercelulares, los principales efectores serían aquellos fenoles que son retenidos por las paredes celulares, principalmente ácido úsnico (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Honegger, 1986), que actúa como inhibidor de la enzima.

c) Tanto sobre la base de una arginasa como efector de parasitismo fúngico, como sobre la posible multiplicidad de formas de una sola enzima en función de su sitio de producción, la aparición de isoformas de arginasa y el cambio en sus propiedades, podría ser un mero reflejo de estados diferentes de desarrollo. Algo semejante fue, ya hace 20 años, sugerido por Martin (1973) al demostrar que la invertasa exocelular de *Parmelia caperata* era fundamentalmente distinta, tanto en su peso molecular como en sus propiedades cinéticas, de la sistetizada por micobionte y ficobionte aislados.

V.- CONCLUSIONES

1ª. Se han purificado cuatro isoformas de arginasa de talos de *Evernia prunastri*. Las denominadas isoformas I y II son intratalinas, inducibles por arginina, y han sido purificadas 148 y 359 veces, con recuperaciones del 4,5% y 1,8%, respectivamente. La isoforma III, también intratalina, constitutiva, ha sido purificada 259 veces con una recuperación del 2,0%. La isoforma IV, glicosilada, inducible y segregable ha sido purificada 616 veces con un rendimiento del 5,6%.

2ª. Se han determinado los pI de las cuatro isoformas, purificadas a homogeneidad por electroenfoque en columna y por electroforesis capilar. Los valores de pI obtenidos por el primer procedimiento, fueron 5,86, 5,83, 6,18 y 5,60 para las isoformas I, II, III y IV, respectivamente. La separación por electroforesis capilar fue desarrollada a dos valores distintos de pH, 7,1 y 9,0, tomándose como valor de pI la media de los dos valores obtenidos. Estas medias fueron 4,90, 5,00, 5,38 y 4,80 para las isoformas I, II, III y IV, respectivamente.

3ª. El análisis de aminoácidos de las cuatro isoformas indica que las isoformas I, II y IV son ricas en Asx, Glx, Ser y Gly, conteniendo de uno a tres residuos Trp por molécula. En cambio, la isoforma III es rica en aminoácidos no polares, como Ala, Val y Leu, conteniendo nueve residuos Trp por molécula.

4ª. El peso molecular de las diferentes isoformas de arginasa fue estimado por HPLC-exclusión molecular, usando dos configuraciones de columna: una columna TSK G5000 PWXL o dos columnas Zorbax-diol en serie, GF450-GF250. Los valores obtenidos fueron de 10 kDa para la isoforma I, 16 kDa para la II, 26 kDa para la III y 20 kDa para la IV, siendo todas ellas monoméricas.

5ª. Sobre los datos precedentes, puede concluirse que las isoformas I y II son muy similares, así como la IV, salvo que, en este último caso, la proteína inducible ha sido segregada. Según Planelles y Legaz (1987) la isoforma IV está glicosilada. La isoforma III, constitutiva, es fundamentalmente diferente de las inducibles.

6ª. Todas las isoformas presentan un máximo de absorción en el ultravioleta de 275-278 nm, que indica la presencia de Tyr.

7ª. En el espectro simultáneo de excitación-emisión de fluorescencia, todas las isoformas presentan un máximo de emisión a 355 nm. La isoforma IV presenta un máximo adicional a 305 nm. Utilizando luces monocromáticas de excitación de 257 nm, 275 nm ó 295 nm, se obtienen máximos de emisión entre 345 y 349 nm, 342-346 nm y 351 nm, respectivamente. Al excitar la isoforma III con luz de 275 nm, aparece otro máximo secundario de emisión a 288 nm, indicativo de Phe.

8ª. Los tres fenoles mayoritarios de *E. prunastri* han sido eficientemente separados por HPLC de fase reversa, usando una columna Nucleosil 5C8 y como fase móvil acetonitrilo:agua:acético, isocrático. La detección fue llevada a cabo usando un detector de longitud de onda variable, a 280 nm para atranorina y ácido úsnico y a 270 nm para el ácido evérnico, coincidentes con sus máximos espectros de absorción.

9ª. Mediante protocolos de extracción diferencial y análisis por HPLC, se han determinado las concentraciones aproximadas de los tres fenoles que pueden tener acceso a las diferentes isoformas de arginasa, para proceder al estudio de su papel como efectores enzimáticos.

10ª. Las isoformas I y II de arginasa son enzimas micaelianas, con valores de K_m para arginina de 1,25 mM y 3,0 mM, respectivamente, determinados por el procedimiento gráfico de Hanes, aunque también se calculó de la representación directa $[S]$ frente a V_0 , y de acuerdo con el procedimiento de Eisenthal-Cornish-Bowden. La isoforma III muestra una cinética sigmoidal de saturación por sustrato, indicativa de alosterismo, con un valor $S_{0,5}$ para arginina de 4,5 mM.

11^a. Los diferentes fenoles muestran ejercer acciones distintas sobre las diferentes isoformas a las concentraciones de efector ensayadas. La isoforma I sufre activación no competitiva por atranorina, activación mixta por ácido evérnico e inhibición competitiva por ácido úsnico. La isoforma III es inhibida por los tres fenoles. Atranorina se comporta como activador mixto y los ácidos evérnico y úsnico como inhibidores no competitivos de la isoforma IV.

12^a. La unión del sustrato, arginina, a las isoformas I y IV se realiza sin cooperatividad, dada su naturaleza micaliana que proporciona un valor de coeficiente de Hill cercano a la unidad. La unión de los diferentes efectores no alteró sensiblemente esta conducta, salvo la unión de la atranorina a la isoforma IV, que aumenta el valor de h a 2. La unión de la arginina a la isoforma III se lleva, sin embargo, a cabo con un grado de cooperatividad (h) de 4,4, siendo sensiblemente incrementado por atranorina y ácido úsnico y débilmente rebajado por ácido evérnico.

13^a. La estimación del número de sitios de unión por molécula de proteína (n) de cada uno de los ligandos (efectores) a las distintas isoformas de arginasa indica que sólo el ácido evérnico es capaz de unirse a sitios específicos en las tres isoformas, sobre la base del bajo número de sitios de unión, que han sido estimados en 4, 8 y 5 para las isoformas I, III y IV, respectivamente. El ligamiento de la atranorina a la isoforma I también se lleva a cabo por 4 sitios de unión específicos. Sin embargo, esta misma atranorina se liga inespecíficamente a las isoformas III y IV, por 26 y 23 sitios de unión, respectivamente. El ácido úsnico actúa como ligando inespecífico para las tres isoformas, con 10 sitios de unión para la isoforma I, 26 para la III y 32 para la IV.

14^a. Se ha calculado la proporción de formas monoméricas y poliméricas tras el ligamiento de los efectores. En todos los casos, predomina la forma nativa sobre las poliméricas. Los tipos de agregados que aparecen con mayor frecuencia son dímeros y trímeros.

Para un mayor seguimiento de las conclusiones, se adjunta la Tabla XVII, resumen de los datos numéricos que las justifican.

1.- PURIFICACION DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | VECES | RENDIMIENTO (%) |
|----------|-------|-----------------|
| I | 148 | 4,5 |
| II | 359 | 1,8 |
| III | 259 | 2 |
| IV | 616 | 5,6 |

2.- PUNTO ISOELECTRICO DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | pI por electroenfoque en columna | pI por E.C. | | |
|----------|-------------------------------------|-------------|------|------|
| | | pH 7 | pH 9 | pI |
| I | 5,86 | 5,33 | 4,50 | 4,9 |
| II | 5,83 | | | |
| III | 6,18 | 5,70 | 5,07 | 5,38 |
| IV | 5,60 | 4,80 | 4,80 | 4,80 |

3.- COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | AMINOACIDOS | Trp (nº de residuos) |
|----------|-----------------------------------|-------------------------|
| I | Ricas en Asx, Glx, Ser y Gly | 1 |
| II | | 3 |
| III | Rica en no polares Ala, Val y Leu | 9 |
| IV | Rica en Asx, Glx, Ser y Gly | 1-2 |

4.- PESO MOLECULAR ESTIMADO EN HPLC POR EXCLUSION

MOLECULAR DE LOS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | COLUMNA | COLUMNAS |
|----------|----------------|-------------------------|
| | TSK G5000 PWXL | ZORBAX-DIOL GF450-GF250 |
| I | 18 | 18 |
| II | 16 | 16 |
| III | 26,5 | 26 |
| IV | 20 | 20 |

Todas son monómeros

5.- ABSORCION UV DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | MAX. ABSORBANCIA |
|----------|------------------|
| I | 275-278 |
| III | 275-278 |
| IV | 275-278 |

6.- EMISION DE FLUORESCENCIA DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| ISOFORMA | MAX. EMISION FLUORESCENCIA | | | ESPECTRO SIMULTANEO |
|----------|----------------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| | (EXCITACION 275) | (EXCITACION 295) | (EXCITACION 257) | |
| I | 346, 305 | 351, hombro 416 | 349, 302 | 355 |
| III | 345, 305, 288 | 331, 351, 397-401 | 349 | 355 |
| IV | 337, 306 | 331, 351, 401 | 345, 290 | 355, 305 |

7.- ABSORCION UV DE FENOLES

| FENOL | MAXIMO ABSORBANCIA |
|----------------|--------------------|
| ATRANORINA | 280 |
| ACIDO EVERNICO | 270 |
| ACIDO USNICO | 280 |

8.- SEPARACION DE FENOLES

HPLC fase reversa; columna Nucleosil 5C8, isocrático $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y fase móvil agua : ácido acético (99:1, v/v)/acetonitrilo (30:70, v/v).

9.- CONSTANTES CINETICAS DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| Isoforma | | K_m (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1}$) |
|----------|--------------------------|---------------|---|
| I | Directo | 1,5 | 2,49 |
| | Eisenthal-Cornish-Bowden | 4,9 | 5,25 |
| | Hanes | 1,25 | 2,79 |
| III | Directo | $S_{0,5-4,5}$ | 2,12 |
| IV | Directo | 4,45 | 3,0 |
| | Eisenthal-Cornish-Bowden | 4,0 | 4,7 |
| | Hanes | 3,0 | 4,2 |

10.- VARIACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS EN PRESENCIA DE FENOLES (K_m (ap) V_{max} (ap))

| Isoforma | K_m (ap) (mM) | | | v_{max} (ap) ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1}$) | | |
|----------|-----------------|----------------|----------------|---|--------------|------------|
| | Atranorina | Ac. evérnico | Ac. úsnico | Atranorin | Ac. evérnico | Ac. úsnico |
| | a | | | | | |
| I | 1,10 | 0,68 | 3,40 | 6,64 | 2,75 | 3,32 |
| | activador | activador | inhibidor | | | |
| | no competitivo | mixto | competitivo | | | |
| III | 4,90 | 4,40 | 4,50 | 0,12 | 0,06 | 0,25 |
| | inhibidor | inhibidor | inhibidor | | | |
| IV | 0,96 | 3,16 | 3,05 | 3,95 | 3,69 | 3,39 |
| | activador | inhibidor | inhibidor | | | |
| | mixto | no competitivo | no competitivo | | | |

11.- COEFICIENTE DE HILL (h)

| Isoforma | En ausencia de efector | En presencia de efector | | |
|----------|------------------------|-------------------------|----------------|--------------|
| | | Atranorina | Acido evérnico | Acido úsnico |
| I | 1,42 | 1,55 | 1,65 | 0,93 |
| III | 4,40 | 5,15 | 3,75 | 5,74 |
| IV | 1,24 | 1,94 | 1,25 | 1,20 |

12.- NUMERO DE SITIOS DE UNION DE LOS DISTINTOS LIGANDOS A LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

| Isoforma | Número sitios (n)* | | |
|----------|--------------------|----------------|--------------|
| | Atranorina | Acido evérnico | Acido úsnico |
| I | 4 | 4 | 10 |
| III | 26 | 8 | 26 |
| IV | 23 | 5 | 32 |

* Estimado de la representación de dobles-inversas de los datos de ligamiento

13.- EFECTO DEL LIGAMIENTO DE LOS FENOLES A LAS ISOFORMAS DE ARGINASA

Polimerizaciones a dímeros y trímeros principalmente.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- Accorsi, A., Piatti, E., Fazi, A., Piacentini, M.P. y Fornaini, G. (1987): Isoelectric points and charge-dependent separation of erythrocyte phosphoglucomutase isoenzymes (PDM₁ and PGM₂). *Italian J. Biochem.* **36**, (4): 267-274.
- Aguirre, R., Kasche, V. (1983): Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. *Eur. J. Biochem.*, **130**: 373-381.
- Ahmadjian, V. (1977). Quantitative requirements and utilization of nutrients: lichens. En *CRC Handbook Series in Nutrition and Food* (Rechcigl, M., ed.), Section D: Nutritional Requirements. Vol. I. Comparative and Qualitative Requirements, pag. 203-215. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Ahmadjian, V. (1987): Coevolution in lichens. *Ann. New York Acad. Sci.*, **503**: 307-315.
- Ahmadjian, V., Jacobs, J.B. (1985): Artificial reestablishment of lichens. VI. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist*, **17**: 149-166.
- Ainslie, G.R., Shill, J.P., Neet, K.E. (1972): Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. *J. Biol. Chem.*, **247**: 7088-7096.
- Ananyan, L.G., Asatryan, M.O. y Danyelian, S.R. (1981): Substrate induction of arginase of lactic acid bacteria *Lactobacillus lactis* 2995 and *Streptococcus lactis* 3864a. Deposited Doc. VINITI. 1148-1181.
- Anderson, S. (1991): Geographical variation and genetic analysis of leaf in *Crepis tectorum* (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.*, **178**: 247-258.
- Avalos, A., and C. Vicente. (1987): The occurrence of lichen phenolics in the photobiont cells of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Reports*, **6**: 74-76.
- Baenziger, J.U. y Green, E.D. (1988): Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: Structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **947**: 287-306.
- Beaven, G.H., Holiday, E.R. (1952): Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Adv. Prot. Chem.*, **7**: 319-386.
- Beevers, L. (1982): Post-translational modifications. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, (Boulter, D. y Parthier, B. Eds.) Vol. 14A, pag. 136-158. Springer Verlag, Berlin.
- Bewley, J.D., Black, M. (1983): *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin
- Blanco, M.J., Suárez, C., Vicente, C. (1984): The use of urea by *Evernia prunastri* thalli. *Planta*, **162**: 305-310.
- Blum, O.B. (1973): Water relations. En *The Lichens* (Ahmadjian, V., Hale, M.E., eds.), pag. 381-400. Academic Press, New York.
- Boutin, J.P. (1982): Purification, properties and subunit structure of arginase from Iris bulbs. *Eur. J. Biochem.*, **v27**: 237-243.
- Borkowich, K., Weiss, R.L. (1987a): Relationship between two major immunoreactive forms of arginase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **169**: 5510-5517.
- Borkovich, K., Weiss, R.L. (1987b): Purification and characterization of arginase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **262**: 7081-7086.
- Botha, F.C., Turpin, D.H. (1990): Fructose-1,6-bisphosphatase in the green alga *Selenastrum minutum*. I. Evidence for the presence of isoenzymes. *Plant Physiol.*, **93**: 1460-1465.

- Bubrick, P., Galun, M. (1980): Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell wall cytochemistry. *Protoplasma*, **104**: 167-173.
- Bubrick, P., Galun, M., Frensdorff, A. (1981): Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell wall. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. *Protoplasma*, **105**: 207-211.
- Bubrick, P., Galun, M., Ben-Yaacov, M., Frensdorff, A. (1982): Antigenic similarities and differences between symbiotic and cultured phycobionts from the lichen *Xanthoria parietina*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **13**: 435-438.
- Bubrick, P., Frensdorff, A., Galun, M. (1985): Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell wall. Isolation and partial purification of an algal-binding protein. *Symbiosis*, **1**: 85-95.
- Campbell, I.D., Dwek, R.A. (1984): *Biological Spectroscopy*, pag. 61- 90. The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc.
- Carvajal, N., Acosta, M., Rodríguez, J.P., Fernández, M., Martínez, J. (1982): Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **701**: 146-148.
- Cerff, R. (1978): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba*. *Plant Physiol.*, **61**: 369-372.
- Chen, F.T.A., Kelly, L., Palmieri, R., Biehler, R., Schwartz, H.E. (1992): Use of high ionic strength buffers for the separation of proteins and peptides with CE. *J. Liquid Chromatogr.*, **15**: 1143-1150.
- Chen, F.T.A., Liu, C.M., Hsieh, Y.Z., Sternberg, J. (1991): Capillary electrophoresis - a new clinical tool. *Clin. Chem.*, **37**: 14-19.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V. (1991): Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, **3**: 1-9.
- Cohen, A.S., Karger, B.L. (1987): High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J. Chromatogr.*, **397**: 409-417.
- Cohen, A.S., Terabe, S., Smith, J.A., Karger, B.L. (1987): HPCE separation of bases, nucleotides, and oligonucleotides: retention manipulation via micellar solutions and metal additives. *Anal. Chem.*, **59**: 1021-1027.
- Compton, S.W., Browlee, R.G. (1988): Capillary electrophoresis. *Biotechniques*, **6**: 432-440.
- Conway, E.J. (1962). *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. Crosby Lockwood, London, pag. 97-102.
- Cooper, T., Kovari, L., Sumrada, R.A., Park, H.D., Luche, R.M., Kovari, I. (1992): Nitrogen catabolite repression of arginase (CAR1) expression in *Saccharomyces cerevisiae* is derived from regulated induced exclusion. *J. Bacteriol.*, **174** (1): 48-55.
- Coutis R.F., Hargesheimer, E.E., Pasutto, F.M. (1979): Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solutions. *J. Chromatogr.*, **179**: 291-299.
- Crabeel, M., Charlier, D., Cunin, R., Boyen, A., Galensdorff, C. y Pierard, A. (1975): Accumulation of arginase precursors in *Escherichia coli*: effects on growth, enzyme repression and application to the selection of arginase auxotroph. *J. Bacteriol.*, **123**: 898-904.
- Cronin, C.N. t Tipton, K.F. (1985): Purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei*. *Biochem. J.*, **227**: 113-124.

- Culberson, C.F., Culberson, W.L., Johnson, A. (1988): Gene flow in lichens. *Amer. J. Bot.*, **75**: 1135-1139.
- Cybis, J., Davis, R.H. (1975): Organization and control in the arginine biosynthetic pathway of *Neurospora*. *J. Bacteriol.*, **123**: 196-202.
- Davankov, V.A., Kurganov, A.A., Unger, K.K. (1990): Reversed-phase HPLC of proteins and polypeptides on polystyrene-coated silica supports. *J. Liquid Chromatogr.*, **13**: 519-530.
- David, J.R., Alonso-Moraga, A., Borai, G., Capy, P., Merçot, P., Maevy, S., Muñoz-Serrano, A., Tsakas, S. (1989): Latitudinal variation of *Adh* gene frequencies in *Drosophila melanogaster*: a Mediterranean instability. *Heredity*, **62**: 11-16.
- De Ruiter, H., Kollöffel, C. (1983): Activity of enzymes of arginine metabolism in the cotyledons of developing and germinating pea seeds. *Plant Physiol.*, **70**: 313-315.
- Denyer, K., Smith, A.M. (1992): The purification and characterization of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta*, **186**: 609-617.
- Deyl, Z., Rohlíček, V., Struzinsky, R. (1989): Some rules applicable to CZE of peptides and proteins. *J. Liquid Chromatogr.*, **12**: 2515-2524.
- Duong, L.T., Eisenstein, E., Green, S.M., Ornberg, R.L. y Hensley, P. (1986): The quaternary structure of ornithine transcarbamoylase y arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **261**: 12807-12813.
- Eisenstein, e., Duong, L.T., Ornberg, R.L., Osborne, J.C. y Hensley, P. (1986): Regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Association of arginase and ornithine transcarbamoylase. *J. Biol. Chem.*, **261**: 12814-12819.
- Escribano, M.I. (1991): Aspectos del metabolismo y transporte de poliaminas en *Evernia prunastri*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Facultad de Biología.
- Escribano, M.I., Legaz, M.E. (1984): L-Ornithine decarboxylase from *Evernia prunastri*. *Phyton*, **44**: 121-124.
- Escribano, M.I., Legaz, M.E. (1985): Putrescine accumulation does not affect RNA metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Endocyt. Cell. Res.*, **2**, 239-248
- Escribano, M.I., Legaz, M.E. (1988): High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine and spermine. *Plant Physiol.*, **87**: 519-522.
- Escribano, M.I., Balaña-Fouce, R., Legaz, M.E. (1993): The effect of spermidine, spermine, and putrescine analogues on transport and adsorption of putrescine by the lichen *Evernia prunastri*. *Plant Physiol. Biochem.*, **31**: en prensa.
- Ewin, A.G., Wallingford, R.A., Olefirowicz, T.M. (1989): Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **61**: 292A-303A.
- Fahselt, D. (1981). Lichen products of *Cladonia stellaris* and *C. rangiferina* maintained under artificial conditions. *Lichenologist*, **13**: 87-91.
- Fahselt, D. (1985): Multiple enzyme forms in lichens. En *Lichen Physiology and Cell Biology* (Brown, D.H., ed.), pag. 129-143. Plenum Press, London
- Fahselt, D. (1986): Multiple enzyme forms of morphotypes in a population of *Cladonia cristatella*. *Bryologist*, **89**: 139-143.
- Fahselt, D. (1987): Electrophoretic analysis of esterase and alkaline phosphatase enzyme forms in single spore cultures of *Cladonia cristatella*. *Lichenologist*, **19**: 71-75.

- Fahselt, D., Hageman, C. (1983): Isozyme banding patterns in two stands of *Cetraria arenaria*. *Bryologist*, **86**: 129-134.
- Fallon, A., Booth, R.F.G., Bell, L.D. (1987): High performance size exclusion chromatography. En Applications of HPLC in Biochemistry. (Burdon, R.H., Van Knippenberg, P.H., eds.), pp. 56-62. Elsevier, Amsterdam.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*. V.H. Freeman and Co. New York. pag 263-292.
- Franz, H. (1990): 100 Jahre Lektinforschung - eine Bilanz. *Naturwissenschaften*, **77**: 103-109.
- Frieden, C., Colman, R.F. (1967): Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant of the effect of purine nucleosides on enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **242**: 1705-1715.
- Garganta, C.L., Bond, J.S. (1986): Assay and kinetics of arginase. *Anal. Biochem.*, **154**: 388-394.
- Gavilanes, J.G., González de Buitrago, G., Pérez-Castelló, R., Rodríguez, R. (1982): Isolation, characterization and amino acid sequence of an ubiquitin-like protein from insect eggs. *J. Biol. Chem.*, **257**: 10267-10270.
- Gilbert, D.G., Richmond, R.C. (1982): Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. XII. Evidence for temperature selection of *Est-6* and *Adh* alleles. *Genetica*, **58**: 109-119.
- Giovannozzi-Sermanni, G., Luna, M. (1981): Laccase activity of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Mus. Sci.*, **11**: 485-496.
- Gockel, S.F., Lehherz, H.G. (1981): "Conformational" isoenzymes of ascarid enolase. *J. Biol. Chem.*, **256**: 3877-3883.
- Goffner, D., Joffroy, I., Pettenati-Grima, J., Halpin, C., Knight, M.E., Schuch, W., Boudet, A.M. (1992): Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta*, **188**: 48-53.
- Gooch, C.F., Monica, T. (1990): Environmental effect on protein glycosilation. *Bio/Technol.*, **8**: 421-427.
- Gordon, M.J., Huang, X., Pentoney, S.L., Zare, R.N. (1988): Capillary electrophoresis. *Science*, **247**: 224-228.
- Gottlieb, L.D. (1977): Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **64**: 161-180.
- Green, S.M., Eisenstein, E., McPhie, P., Hensley, P. (1990): The purification and characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **265**: 1601-1697.
- Green, S.M., Ginsburg, A., Lewis, M.S. y Hensley, P. (1991): Roles of metals ions in the Maintenance of the tertiary and quaternary structure of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **266**: 21474-21481.
- Greenberg, D.M. (1955): Arginase. En *Methods in Enzymology*, Vol. 2 (Kolowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), pag. 368-374. Academic Press, New York.
- Griffiths, J., Black, J. (1987): Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clin. Chem.*, **33**: 2171-2177.

- Gross, L., Yeung, E.S. (1990): Indirect fluorimetric detection of cations in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **62**: 427- 431.
- Grossman, P.D., Colbern, J.C., Lauer, H.H. (1989): Applications of free solution capillary electrophoresis to the analytical scale separation of protein and peptides. *Anal. Chem.*, **61**: 1186-1194.
- Guisse, A., Bertru, G. (1987): Analyse de quelques acides phénoliques dans les extraits de litière par HPLC. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **24**: 1-9.
- Hageman, C., Fahselt, D. (1984): Intraspecific variability of isozymes of the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*. *Bryologist*, **89**: 285-290.
- Hageman, C., Fahselt, D. (1986a): Constancy of enzyme electrofocusing patterns in a stand of the lichen *Umbilicaria mammulata*. *Can. J. Bot.*, **62**: 617-626.
- Hageman, C., Fahselt, D. (1986b): A comparison of isozyme patterns in morphological variants in the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*. *Bryologist*, **86**: 285-290.
- Hatakeyama, K., Harada, T., Suzuki, S., Watanabe, Y. y Kagamiyama, H. (1989): Purification and characterization of rat liver GTP cyclohydrolase I. Cooperative binding of GTP to the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **264** (36): 21660-21664.
- Henderson, P.J.F. (1992): Statistical analysis of enzyme kinetic data. En *Enzyme Assays. A Practical Approach*. (Eisenthal, R. y Danson, M.J. eds.). pag. 277-317. Oxford University Press.
- Herrero, P., Pedrosa, M.M., Norato, J., Vicente, C. (1989): Some features about usnic acid accumulation and its movement between the symbionts of the lichen *Evernia prunastri*. *J. Plant Physiol.*, **135**: 170-174
- Herzfeld, A., Raper, S.M. (1976): The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.*, **153**: 469-475.
- Hirs, C.H.W. (1967): Performic acid oxidized samples were used to determine half-cysteine content. En *Methods in Enzymology*. Vol. 11. Performic Acid Oxidation, pag. 197-199. Academic Press, New York.
- Hirsch-Kolb, H., Greenberg, D.M. (1968): Molecular characteristics of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.*, **243**: 6123-6129.
- Hjerten, S., Elenbring, K., Kilar, F. (1987): Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus. *J. Chromatogr.*, **403**: 47-61.
- Honegger, R. (1986): Ultrastructural studies in lichens. II. Myco- and phycobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four *Parmeliaceae*. *New Phytol.*, **103**: 797-808.
- Honoré, B., Brodersen, R. (1983): Albumin binding of anti- inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis. *Mol. Pharmacol.*, **25**: 137-150.
- Ikemoto, M., Tabata, M., Miyako, T., Kono, T., Ori, M., Totani, M., Murachi, T. (1990): Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product. *Biochem. J.*, **270**: 697-703.
- Ikemoto, M., Tabata, M., Murachi, T. y Totani, M. (1989): Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann. Clin. Biochem.*, **26**: 547-553.

- Ishida, T., Horiike, K., Tojo, H., Nozaki, M. (1988). Interaction of protein with a self-associating ligand. Deviation from a hyperbolic binding curve and the appearance of apparent co-operativity in Scatchard plot. *J. Theor. Biol.*, **130**: 49-66.
- IUPAC-IUB Commission on Biological Nomenclature (1981): The nomenclature of multiple molecular forms of enzymes recommendations. *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**: 1-3.
- Janin, J., Chothia, C. (1990): The structure of protein- protein recognition sites. *J. Biol. Chem.*, **265**: 16027.
- Jogerson, J.W., Lukas, K.D. (1981): Zone electrophoresis in open- tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, **53**: 1298-1302.
- Kang, J.H., Cho, Y.D. (1990): Purification and properties of arginase from soybean (*Glycine max*) axes. *Plant Physiol.*, **93**: 1230-1234.
- Kanyo, Z.F., Chen, Ch.Y., Daghigh, F., Ash, D.E., Christianson, D.W. (1992): Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J. Mol. Biol.*, **224**: 1175-1177.
- Kershaw, K.A., MacFarlane, J.D., Webber, M.R., Fovarge, A. (1983): Phenotypic differences in the seasonal pattern of net photosynthesis in *Cladonia stellaris*. *Can. J. Bot.*, **61**: 2169-2180.
- Killias, A., Gelfi, C., Righetti, P.G. (1988): Isoenzyme analysis of lichen algae in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **9**: 187-191.
- Klotz, I.M. (1989): Ligand-protein binding affinities. En *Protein Function. A Practical Approach* (Creighton, T.E., ed.), pag. 25- 54. IRL Press, London.
- Klotz, I.M., Hunston, D.L. (1971): Properties of graphical representation of multiple classes of binding sites. *Biochemistry*, **10**: 3065-3069.
- Klotz, I.M., Hunston, D.L. (1977): Analytical and graphical examination of strong binding by half-of-sites in proteins: illustration with aspartate transcarbamylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4959-4963.
- Lauer, H.H., McManigill, P. (1986): Capillary electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Anal. Chem.*, **58**: 166-178.
- Lauzurica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Díaz, R., González, J., García, R., Lahoz, C. (1988): Alergens from *Olea europaea*. II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol. Immunol.*, **25**: 337-344.
- Legaz, E. (1985): The regulation of urea biosynthesis. En *Surface Physiology of Lichens* (Vicente, C., Brown, D.H., Legaz, M.E., eds.), pag. 57-72. Editorial Universidad Complutense, Madrid.
- Legaz, M.E. (1991): Regulation of different arginase forms in *Evernia prunastri* thallus. *Symbiosis*, **11**: 263-277.
- Legaz, M.E., Escribano, M.I. (1987): Uptake and accumulation of putrescine in the lichen *Evernia prunastri*. *Endocyt. Cell Res.*, **4**: 79-89.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1980): Arginase regulation in *Evernia prunastri*. *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, **1**: 407-414.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1981): Location of several enzymes of L- arginine catabolism in *Evernia prunastri* thallus. *Z. Naturforsch.*, **36c**: 692-693.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1982): Two forms of arginase in *Evernia prunastri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**: 1441-1446.

- Legaz, M.E., Vicente, C. (1983): Endogenous inactivators of arginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol.*, **71**: 300-302.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1989): Regulation of urease activity *Cladina dendroides* and its photobiont by lichen phenols. *Plant Sci.*, **63**: 15-24.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1991a): Advances in lichen enzymology. *Proc. Intern. Symposium on Lichenology*, pp. 22-60. Nippon Paint Co., Osaka.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1991b): An experimental approach to molecular biology of lichens: regulation of catabolite-sensitive promoters in some *Usneaceae*. *Journ. Hattori Bot. Lab.*, **70**: 167-180.
- Legaz, M.E., Avalos, A., de Torres, M., Escribano, M.I., González, A., Martín-Falquina, A., Pérez-Urria, E., Vicente, C. (1986): Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environm. Exptl. Bot.*, **26**: 385-396.
- Legaz, M.E., Balaña-Fouce, R., Escribano, M.I. (1993a): Kinetic of putrescine uptake in the lichen *Evernia prunastri*. *Plant Physiol. Biochem.*, **31**: en prensa.
- Legaz, M.E., De Torres, M., Escribano, M.I. (1985): Putrescine affects mannitol metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Photosynthetica*, **19**:230-236.
- Legaz, M.E., Escribano, M.I., Vicente, C. (1993b): Changes in the level of endogenous polyamines in *Evernia prunastri* thallus depending on the external pH. En *Endocytobiology V* (Ishikawa, T., Schenck, H.E.A., eds.). Heidelberg University Press, Heidelberg, en prensa.
- Legaz, M.E., Iglesias, A., Vicente, C. (1983): Regulation of agmatine iminohydrolase of *Evernia prunastri* by L-arginine metabolites. *Z. Pflanzenphysiol.*, **110**: 53-59.
- Legaz, M.E., de Armas, R., Martínez, M., Medina, I., Vicente, C. (1991): Binding studies of Mn^{2+} to a glycosidase system from sugar cane juice. *Plant Physiol. Biochem.*, **29**: 601-605.
- Legaz, M.E., Pedrosa, M.M., Mateos, J.L., Caffaro, S.V., Vicente, C. (1992): High-performance liquid chromatography determination of acridine orange in nucleic acids isolated from dye-treated *Himantormia lugubris*. *J. Chromatogr.*, **607**: 245-251.
- Legget-Bailey, I. (1967): *Techniques in Protein Chemistry*, pag. 278. Elsevier, Amsterdam.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé J.C., Denarié, J. (1990): Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, **334**: 781-784.
- Li, J.Y., Saidha, T., Shifft, J.A. (1991): Purification and properties of two forms of ATP sulfurylase from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1065**: 68-76.
- Lischwe, M.A., Ochs, D. (1982): A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver stain in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **127**: 453-457.
- Lockhart, C.M., Rowell, P., Stewart, W.D.P. (1978): Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **3**: 127-130.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lux, J.A., Yin, H.F., Schomberg, G. (1990): Construction, evaluation and analytical operation of a modular capillary electrophoresis instrument. *Chromatographia*, **30**: 7-15.

- MacFarlane, J.D., Kershaw, K.A., Webber, M.R. (1983): Physiological-environmental interactions in lichens. XVII. Phenotypic differences in the seasonal pattern of net photosynthesis in *Cladonia rangiferina*. *New Phytol.*, **94**: 217-233.
- Maggini, S., Stoecklin-Tschan, F.B., Mörkofer-Zwez, S. y Walter, P. (1992): New kinetic parameters for rat liver arginase measured at near-physiological steady-state concentrations of arginine and Mn^{2+} . *Biochem. J.* **283**: 653-660.
- Majeau, N., Trudel, J., Asselin, A. (1990): Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant Sci.*, **68**: 9-16.
- Markert, C.L., Moller, F. (1959): Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **45**: 753-763.
- Martin, E.J. (1973): Studies on invertase from the thallus of the lichen *Parmelia caperata*. *Van. J. Sci.*, **24**: 134-139.
- Martín-Falquina, A., Legaz, M.E. (1984): Purification and properties of the constitutive arginase of *Evernia prunastri*. *Plant Physiol.*, **76**: 1065-1069.
- Marx, M., Peveling, E. (1983): Surface receptors in lichen symbionts visualized by fluorescence microscopy after use of lectins. *Protoplasma* **114**: 52-61.
- Matsubara, S. y Suzuki, Y. (1984): Arginase activity in the cotyledons of soybean seedlings. *Physiol. Plant*, **62**: 309-314.
- Mendel, C.M., Licko, V., Kane, J.P. (1985): The effect of ligand heterogeneity on the Scatchard plot. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3451-3455.
- Merkler, D.J., Schramm, V.L. (1990): Catalytic and regulatory site composition of yeast AMP deaminase by comparative binding and rate studies. *J. Biol. Chem.*, **265**: 4420-4426.
- Messenguy, F., Dubois, E. (1983): Participation of transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms in the control of arginine metabolism in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **189**: 148-156.
- Meunier, J.C., Buc, J., Navarro, A., Ricard, J. (1974): Regulatory behavior of monomeric enzymes. 2. A wheat-germ hexokinase as a mnemonical enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **49**: 209-223.
- Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, T.P. (1979): High performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **169**: 11-20.
- Molina, M.C., Vicente, C. (1993): Loss of photoergonic conditions of *Xanthoria parietina* photobiont effected by an algal-binding protein isolated from the same lichen species. *En Endocytobiology V* (Ishikawa, T., Scheck, H.E., eds.), Heidelberg University Press, Heidelberg, en prensa.
- Molina, M.C., Muñoz, E., Vicente, C. (1993): Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. *Plant Physiol. Biochem.* **31**: 131-142.
- Mora, J., Tarrab, R., Martuscelli, J., Soberon, G. (1965): The regulation of urea biosynthesis enzymes in vertebrates. *Biochem. J.*, **96**: 588-594.
- Moreno-Vivian, C., Soler, G., Castillo, F. (1992): Arginine catabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. Purification and properties of arginase. *Eur. J. Biochem.*, **204**: 531-537.
- Motojima, K., Sakaguchi, K. (1982): Part of the lysyl residues in wheat α -amylase is methylated as a N-E-trimethyl lysine. *Plant & Cell Physiol.*, **23**: 709-712.
- Munson, P.J., Rodbar, D. (1980): Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.*, **107**: 220-239.

- Murphy, J., Brad-Stutte, C.A. (1977): Analysis for substituted benzoic and cinnamic acids using HPLC. *Anal. Biochem.*, **86**: 220-228.
- Nagy, D.J. (1990): Universal calibration in aqueous size exclusion chromatography with on-line differential viscosimetry using commercial TSK-PW columns. *J. Liquid Chromatogr.*, **13**: 677-691.
- Nanni, E.J., Lovette, M.E., Hicks, R.D., Fowler, K.W., Borgerding, M.F. (1988): Separation and quantification of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke by capillary GC/MSD/SIM. *Amer. Chem. Soc. Southeast Reg. Meeting, Atlanta, GA. Abstract*, pp. 143.
- Neet, K.E. (1980): Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *En Methods in Enzymology. Vol. 64. Enzyme Kinetics and Mechanisms. Part B. Isotopic Probes and Complex Enzyme Systems.* (Purich, D.L., Ed.), pag. 139-192. Academic Press, N.Y.
- Neet, K.E., Ainslie, R. (1980): Hysteretic Enzymes. *En Methods in Enzymology. Vol. 64. Enzyme Kinetics and Mechanisms. Part B. Isotopic Probes and Complex Enzyme Systems.* (Purich, D.L., Ed.), pag. 193-227. Academic Press, N.Y.
- Newton, K.J., Schwartz, D. (1990): Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize. *Genetics*, **95**: 425-442.
- Oakeshott, J.G., Gibson, J.B., Anderson, P.R., Knibb, W.R., Anderson, D.G., Chambers, G.K. (1982): Alcohol dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase clones in *Drosophila melanogaster* on three continents. *Evolution*, **36**: 86-96.
- O'Fagain C., Bond, U., Orsi, B.A., Mantle, T.J. (1982): The slow kinetic transients of arylsulphatase A. *Biochem. J.*, **201**: 345-352.
- Ogan, K., Katz, E. (1981): Liquid chromatographic separation of alkylphenols with fluorescence and ultraviolet detection. *Anal. Chem.*, **53**: 222-227.
- O'Malley, D.M., Sederoff, R.R. (1990): Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from developing xylem of loblolly pine, and its role in strategies to modify the lignin content in wood. *J. Cell. Biochem.*, **14E Suppl.**: 335-337.
- Patchett, M.L., Daniel, R.M. y Morgan, H.W. (1991): Characterization of arginase from the extreme thermophile *Bacillus caldovelox*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1077**: 291-298.
- Pawashe, A.B., Srivastava, S.K. (1987): Effect of an endogenous factor on arginase activity in germinating Bengal gram (*Cicer arietinum*) seeds. *Physiol. Plant.*, **71**: 229-235.
- Pedersen, A.O., Hust, B., Andersen, S., Nielsen, F., Brodersen, R. (1986): Laurate binding to human serum albumin. Multiple binding equilibria investigated by a dialysis exchange method. *Eur. J. Biochem.*, **154**: 545-552.
- Pedroso, E., Grandas, A., Amor, J.C., Giralt, E. (1987): Reversed-phase HPLC of protected peptide segments. *J. Chromatogr.*, **409**: 281-290.
- Pérez-Urria, E., and Vicente, C. (1989): Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri*. *J. Plant Physiol.* **133**: 692-695.
- Pérez-Urria, E., Rodriguez, M., Vicente, C. (1989a): Algal partner regulates fungal urease in the lichen *Evernia prunastri* by producing a protein which inhibits urease synthesis. *Plant Mol. Biol.*, **13**: 665-672.
- Pérez-Urria, E., Vicente, C., Xavier Filho, L. (1989b): Screening of urease production and secretion by seven species of Finish lichens. *Biochem. System. Ecol.*, **17**: 359-363.
- Perlman, D., Raney, P., Halvorson, H.O. (1984): Cytoplasmic and secreted *Saccharomyces cerevisiae* invertase mRNA's encoded by gene can be differentially or coordinately regulated. *Mol. Cell Biol.*, **4**: 1682-1688.

- Pico, G.A., Houssier, C. (1989): Bile salts-bovine serum albumin binding: spectroscopic and thermodynamic studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **999**: 128-134.
- Planas, D., Sarhan, F., Duke, L., Godmaire, H., Cadieux, C. (1981): Ecological significance of phenolic compounds in *Myniophyllum spicatum*. *Verh. Intern. Ver. theor. Angew. Limnol.*, **21**: 1492- 1496.
- Planelles, V., Legaz, M.E. (1987). Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci.*, **51**: 9-16.
- Pohjanpelto, P., Hölttä, E. (1983): Arginase activity of different cells in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **757**: 191-195.
- Price, N.C., Dwek, R.A. (1982): Problems in Physical Chemistry for Biochemists. pag. 32-45. Oxford University Press, Oxford.
- Price, N.C., Stevens, L. (1986): Fundamentals of Enzymology, pag. 208-262. Oxford University Press, Oxford.
- Priest, F.G. (1987). Extracellular enzymes. En *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 1. The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals (Bull, A.T. y Dalton, H., eds.), pag. 587-604. Pergamon Press, Oxford.
- Rai, A.N. (1988): Nitrogen metabolism. En *Handbook of Lichenology* (Galun, M., ed.), Vol. I, pag. 201-237. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., Galston, A.W. (1985): Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6874-6878.
- Ravise, A., Kirkiachrian, B.S., Chopin, J., Kunesch, G. (1980): Phenolic compounds and structural analogs of phytoalexins. Influence of structure and substituents on the *in vitro* inhibition of micromycetes and some lytic enzymes. *Phytopathol.*, **12**: 335-336.
- Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1985): Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1979-1983.
- Ricard, J., Meunier, J.C., Buc, J. (1974): Regulatory behavior of monomeric enzymes. 1. The mnemonical enzyme concept. *Eur. J. Biochem.*, **49**: 195-208.
- Rickard, E.C., Strohl, M.M., Nielsen, R.G. (1991): Correlation of electrophoresis mobilities from capillary electrophoresis with physico-chemical properties of proteins and peptides. *Anal. Biochem.*, **197**: 197-204.
- Rider, C.C., Taylor, C.B. (1980): Isoenzymes, pag. 14-54. Chapman and Hall, London.
- Risner, C.H., Cash, S.L. (1990): A high-performance liquid chromatographic determination of major phenolic compounds in tobacco smoke. *J. Chromatogr. Sci.*, **28**: 239-244.
- Rodríguez, M., Vicente, C. (1991): Water status and urease secretion from two ecotypes of *Xanthoria parietina*. *Symbiosis*, **11**: 255-262.
- Rodríguez, M., Vicente, C., Pérez-Urria, E. (1989): Some physico- chemical properties of a protein inhibiting urease synthesis, produced by the lichen *Pseudevernia furfuracea*. *Endocyt. C. Res.*, **6**: 193-202.
- Rundel, P.W. (1978): The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem. System. Ecol.*, **6**: 157-170.
- Sairam, M.R. (1989): Role of carbohydrates in glicoprotein hormone signal transduction. *FASEB.J.*, **3**: 1915-1926.
- Samuel, R., Pinsker, W., Balasubramanian, S., Morawetz, W. (1991): Allozyme diversity and systematics in *Annonaceae*- a pilot project. *Plant Syst. Evol.*, **178**: 125-134.
- Scandalios, J.G. (1974): Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 225-258.

- Scatchard, G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. New York Acad. Sci.*, **51**: 660-672.
- Schrell, A., Alt-Moerbe, J., Lanz, T., Schroeder, J. (1989): Arginase of *Agrobacterium* Ti plasmid C58. DNA sequence, properties, and comparison with eucaryotic enzymes. *Eur. J. Biochem.* **184**: 635-641.
- Shannon, L.M., Hankins, C.N. (1981): Enzymatic properties of phytohaemagglutinins. En *The Phytochemistry of Cell Recognition and Cell Surface Interactions* (Loewus, F.A. y Ryan, C.A., eds.), pag. 93-114. Plenum Press, New York & London.
- Skrzypek-Osiecka, I. y Poremska, Z. (1983): Hybridization of subunits of rat liver arginase A₁ and rat kidney arginase A₄. *Acta Biochim. Pol.*, **30**: 93-97.
- Skultz, H., Hagg, M., Djunsund, B. (1990): Seasonal variation of isozyme and total protein phenotypes in populations of the lichen *Parmelia omphalodes* (Ascomycetes). *Ann. Bot. Fennici*, **27**: 47-52.
- Sono, M. (1989): Spectroscopic and equilibrium studies of ligand and organic substrate binding to indolamine-2,3-dioxygenase. *Biochemistry*, **29**: 1451-1460.
- Soru, E. (1983): Chemical and immunological properties of *Bacillus anthracis* arginase and its metabolic involvement. *Mol. Cel. Biochem.*, **50**: 173-183.
- Spector, E. B., Rice, S. C. H., Moedjono, S., Bernard, B. y Cederbaum, S.D. (1982): Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem. Med.*, **28**: 165-175.
- Spolarics, Z., Bond, J.S. (1988): Multiple molecular forms of mouse liver arginase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**: 469-479.
- Standard Methods (1955): American Public Health Association Inc, pp. 390. New York.
- Sticher, L., Jones, R.L. (1992): α -Amylase isoforms are post-translationally modified in the endomembrane system of the barley aleurone layer. *Plant Physiol.*, **98**: 1080-1086.
- Strack, D., Feige, G.B., Kroll, R. (1979): Screening of aromatic secondary lichen substances by HPLC. *Z. Naturforsch.*, **34c**: 695-698.
- Talor, A.A. y Stewart, G.R. (1981): Tissue and subcellular localization of enzymes to arginine metabolism in *Pisum sativum*. *Biophys. Res. Commun.*, **101**: 1281-1289.
- Tapper, R. (1981): Glucose uptake by *Trebouxia* and associated fungal symbiont in the lichen symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **10**: 103-106.
- Tarrab, R., Rodríguez, J., Huitron C., Palacios, R., Suneron, G. (1974): Molecular forms of rat-liver arginase. Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.*, **49**: 657-668.
- Teng-Leary, E., Kohlhaw, G.B. (1973): Mechanism of feedback inhibition by leucine. Binding of leucine to wild-type and feedback-resistant α -isopropylmalate synthase and its structural consequences. *Biochemistry*, **12**: 2980-2986.
- Tipton, K.F. (1992): Principles of enzyme assay and kinetic studies. In *Enzyme Assay. A Practical Approach* (Eisenthal, R., Dawson, M.J., eds.), pag. 1-58. IRL Press, Oxford.
- Totani, M. (1973): Purification and properties of pig liver arginase. *J. Nagoya City Univ. Med. Assoc.*, **24**: 196-211.
- Trudel, J., Audy, P., Asselin, A. (1989): Electrophoretic forms of chitinase activity in *xanthine* tobacco healthy and infected with tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **2**: 315-324.
- Tsuji, K. (1991): HPCE of proteins: SDS polyacrylamide gel filled capillary column for the determination of recombinant biotechnology-derived proteins. *J. Chromatogr.*, **550**: 823-828.

- Turpin, D.H., Botha, F.C., Smith, R.G., Feil, R., Horsey, A.K., Vanlerberghe, G.C. (1990): Regulation of carbon partitioning to respiration during dark ammonium assimilation by the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.*, **93**: 166-175.
- Ujházy, A., Zsádon, B., Szejtli, J. (1989): Gel chromatographic separation of proteins on cyclodextrin based polymer stationary phases. *J. Liquid Chromatogr.*, **12**: 2877-2885.
- Vicente, C. (1990): The concept of endohabitat in phycobiont-containing lichens. II. The role of secreted enzymes. *Endocyt. Cell Res.*, **7**: 61-72.
- Vicente, C., Blanco, M.J. (1985): Effect of an exogenous supply of urea on the content and secretion of soluble carbohydrates of *Evernia prunastri*. *Can. J. Bot.*, **63**: 1344-1349.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1981): Purification and properties of L-arginine decarboxylase of *Evernia prunastri*. *Plant & Cell Physiol.*, **22**: 1119-1123.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1982): Purification and properties of agmatine amidinohydrolase of *Evernia prunastri*. *Physiol. Plant.*, **55**: 335-339.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1983): Regulation of urea production in *Evernia prunastri*: effects of L-arginine metabolites. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**: 123-131.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1985): Repression of arginase and agmatine amidinohydrolase by urea in the lichen *Evernia prunastri*. *Physiol. Plant.* **24**: 217-219.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1988a): The concept of endohabitat in phycobiont-containing lichens. I. The role of intercellular space in the regulation of enzyme activity. *Endocyt. Cell Res.*, **5**: 205-214.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1988b): Lichen enzymology. En *Handbook of Lichenology*, Vol. I. (Galun, M., ed.), pp. 239-281. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1992): Biología de la simbiosis. En *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno* (González, J., Lluch, C. eds.), pp. 37-54. Editorial Rueda, Madrid.
- Vicente, C., Pérez-Urria, E. (1989): Production and secretion of urease by *Evernia prunastri* thallus and its symbionts. *Endocyt. Cell Res.*, **6**: 87-97.
- Warzecha, L., Piwowar, Z. y Bodzek, D. (1990): Gel permeation Chromatography for the determination of the molecular mass distribution of some industrial proteins. *J. Chromat.*, **509**: 227-231.
- Weeden, N.F., (1983): Evolution of plant isozymes. En *Isozymes in Plant Genetics and Breeding* (Tanksley, S.D., Orton, T.J., eds.), Part A, pag. 175-205. Elsevier, Amsterdam.
- Weiss, R.L., Davis, R.H. (1973): Intracellular localization of enzymes of arginase metabolism in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **248**: 5403-5408.
- Weiss, R.L., Davis, R.H. (1977): Control of arginine utilization in *Neurospora*. *J. Bacteriol.*, **129**: 866-873.
- West, H.M., Walters, D.R. (1989): Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth of *Pyrenopeziza teres*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium culmorum* and *Septoria nodorum* in vitro. *Mycol. Res.*, **92**: 453-457.
- Wheeler, A., Lauzurica, P., García, R., Hickman, B., Lahoz, C. (1987): Identification of a major allergen in olive tree (*Olea europaea*) pollen extract. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.*, **2**: 228.
- Whitney, P.A. y Magasaniki, B. (1973): The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **248**: 6197-6202.

- Widhalm, A., Schwer, C., Blass, D., Kenndler, E. (1991): Capillary zone electrophoresis with a linear, non-cross linked polyamide gel: separation of proteins according to molecular mass. *J. Chromatogr.*, **549**: 446-453.
- Winterburn, P.J., Phelps, C.F. (1972): The significance of glycosylated proteins. *Nature*, **236**: 147-151.
- Wright, L.C., Brady, C.J., Hinde, R.W. (1981): Purification and properties of the arginase from Jerusalem artichoke tubers. *Phytochemistry*, **20**: 2641-2645.
- Wu, C.S., Senak, L., Malawer, E.G. (1989): Size-exclusion chromatography of poly (methyl vinyl ether-CO-maleic anhydride). I. Chromatographic method. *J. Liquid Chromatogr.*, **12**: 2901-2918.
- Yamamoto, S., Nomura, M., Sano, Y. (1990): Predicting the performance of gel-filtration chromatography of proteins. *J. Chromatogr.*, **512**: 77-87.
- Yuan, D., Pietrzyk, D.J. (1990): Separation and indirect detection of small-chain peptides chromophoric mobile phase additives. *J. Chromatogr.*, **509**: 357-368.
- Zhu, M., Rodriguez, R., Hansen, D., Wehr, T. (1990): Capillary electrophoresis of proteins under alkaline conditions. *J. Chromatogr.*, **516**: 123-131.